

H5

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-504258

⑬ 公表 平成5年(1993)7月8日

⑭ Int.Cl.⁹
C 12 N 15/12
C 07 K 13/00

識別記号
ZNA

庁内整理番号
8619-4H
8931-4B

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

A※

(全 20 頁)

⑯ 発明の名称 ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの製造方法

⑰ 特 願 平3-505560

⑱ 出 願 平3(1991)2月8日

⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)8月6日

⑳ 国際出願 PCT/US91/00909

㉑ 国際公開番号 WO91/12273

㉒ 国際公開日 平3(1991)8月22日

優先権主張 ㉓ 1990年2月8日 ㉔ 米国(US) ㉕ 478,100

⑳ 発 明 者 スレジエブスキ, アンドルフエ イ ゼフト. アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シアトル, サーティース アベニュー ノースイースト 14543

㉑ 出 願 人 ザイモジエネティクス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国, ワシントン 98105, シアトル, ルーズベルト ウェイ ノースイースト 4225

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CA, CF(広域特許), CG(広域特許), CH(広域特許), CM(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL(広域特許), NO, PL, RO, SD, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列であって、前記レセプターが酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成ることを特徴とするDNA配列。

2. 前記酵母Gタンパク質結合レセプターが、サッカロミセス セレビスシアエ STE2遺伝子生成物、サッカロミセス セレビスシアエ STE3遺伝子生成物及びサッカロミセス クルイベリ STE2遺伝子生成物から成る群から選択される請求の範囲第1項記載のDNA配列。

3. 前記酵母Gタンパク質結合レセプターが、サッカロミセス セレビスシアエ STE2遺伝子生成物である請求の範囲第1項記載のDNA配列。

4. 前記哺乳類Gタンパク質結合レセプターが、 β -アドレナリンレセプター、 α -アドレナリンレセプター、ムスカリンレセプター、アンギオテンシンレセプター、物質Kレセプター及びロドプシンレセプターから成る群から選択される請求の範囲第1項記載のDNA配列。

5. 前記哺乳類Gタンパク質結合レセプターが、ヒト β -アドレナリンレセプター、ヒト β -アドレナリンレセプター、ヒト α -アドレナリンレセプター、ヒトムスカリンレセプター、ヒトロドプシンレセプター、ヒトアンギオテンシンレセプター及びヒト物質Kレセプターから成る群から選択される請求の範囲第1項記載のDNA配列。

6. 前記哺乳類Gタンパク質結合レセプターのドメインが、細胞

外アミノ末端ドメインの少なくとも一部、エフェクタードメイン、第3内部エフェクタードメイン及びカルボキシ末端内部エフェクタードメインから成る群から選択される請求の範囲第1項記載のDNA配列。

7. 前記哺乳類Gタンパク質結合レセプターの細胞外アミノ末端ドメイン及びエフェクタードメインが、酵母Gタンパク質結合レセプターのそれぞれの細胞外アミノ末端ドメイン及びエフェクタードメインにより置換される請求の範囲第1項記載のDNA配列。

8. カルボキシ末端内部エフェクタードメイン、第3内部エフェクタードメイン及びカルボキシ末端内部エフェクタードメイン並びに第3内部エフェクタードメインから成る群から選択された、哺乳類Gタンパク質結合レセプターのエフェクタードメインが、酵母Gタンパク質結合レセプターのそれぞれのカルボキシ末端内部エフェクタードメイン、第3内部エフェクタードメイン及びカルボキシ末端内部エフェクタードメイン並びに第3内部エフェクタードメインにより置換される請求の範囲第7項記載のDNA配列。

9. 酵母細胞における生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体であって、次の操作的に結合された要素：

転写プロモーター；

請求の範囲第1項のいずれか1項記載のDNA配列；及び

転写ターミネーター

を含んで成るDNA構造体。

10. 請求の範囲第9項記載のDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞。

11. 前記酵母宿主細胞がサッカロミセス セレビスシアエ細胞である請求の範囲第10項記載の酵母宿主細胞。

12. 前記酵母宿主細胞が遺伝的に欠陥の STE2 又は STE3 遺伝子を含む請求の範囲第11項記載の酵母宿主細胞。

13. 前記酵母宿主細胞が接合型 α 半致死細胞である請求の範囲第11項記載の酵母宿主細胞。

14. 前記酵母宿主細胞が接合型 α 半致死細胞である請求の範囲第11項記載の酵母宿主細胞。

15. 前記酵母宿主細胞が機能的な BAR1 遺伝子を含まない請求の範囲第14項記載の酵母宿主細胞。

16. 前記宿主細胞がまた、インジケータ-DNA配列に操作的に結合される接合型特異的遺伝子プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体により形質転換され、そして前記検出段階が前記インジケータ-DNA配列の発現を検出することを含んで成る請求の範囲第11項記載の酵母宿主細胞。

17. 前記酵母宿主細胞が、E. coli lacZコード配列に操作的に結合される BAR1プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体により形質転換され、そして前記第2 DNA構造体が BAR1 遺伝子座で組み込まれる請求の範囲第14項記載の酵母宿主細胞。

18. 試験サンプルにおけるリガンドの存在を検出するための方法であって：

a) 請求の範囲第10～17のいずれか1項記載の酵母宿主細胞の培養物を、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターへのリガンドの結合を可能にするための適切な条件下で試験サンプルに暴露し、そして

b) 宿主細胞の生物学的応答を検出し、そして、それからリガンドの存在を決定する段階を含んで成る方法。

19. 前記細胞が適切な固体増殖培地の上部の寒天層において培養される請求の範囲第18項記載の方法。

明 細 書

ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの製造方法

技術分野

本発明は、一般的に、タンパク質の発現及びより特定には、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの酵母における発現を旨とする。

発明の背景

高等真核細胞において、リガンド（たとえばホルモン）とレセプターとの間の相互作用は、細胞外シグナルの伝達及びそれに対する応答において重要な作用である。多くの生理学的に重要な物質は、細胞表面レセプターに結合し、そしてそれに対して作用することによって細胞応答を誘発する。そのような物質の例は、エピネフリン、ノルエピネフリン、イソプロテノール及びアセチルコリンを含む。リガンド-レセプター結合機構は、適切な細胞応答を提供するためにエフェクター機構に結合される。これらの機構は、常ではないが、しばしば、細胞膜中に送達される単一のタンパク質に結合される。

1つの種類のレセプターは、リガンド-レセプター結合機構とエフェクター機構との間に介入されるタンパク質の存在を必要とする。リガンドへの結合に基づいて、この種類のレセプターは、活性化されるべき特定の細胞機構への細胞表面からのリガンド結合シグナル (Gilman, *Cell* 36: 577-579, 1984 及び *Biochemistry* 25: 2657-2664, 1987を参照のこと) の伝達を促進するグアニンヌクレオチド結合調節タンパク質 (Gタンパク質として言及される) と相

互作用する。この種類のレセプターは一般的にGタンパク質結合レセプターとして言及される。

Gタンパク質結合レセプターは、血管拡張、心拍の刺激又は低下、気管支拡張、内分泌の刺激及び腸のぜん動の刺激を包含する重要な生理学的応答を仲介する。1つの種類のGタンパク質結合レセプター、すなわちアドレナリンレセプターは種々の高等真核組織に見出され、そして種々の生理学的応答を仲介する (Leffkowitzなど、*Ann. Rev. Biochem.* 52: 159-186, 1983を参照のこと)。Ahliquist (Am. J. Physiol. 153: 586-600, 1948) は、アドレナリンレセプターは、一連のリガンドの活性の順序に基づいて2種のクラス、すなわち α 及び β に分かれることを提案した。Lands (*Endocr.* 214: 587-598, 1964), Starke (*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77: 1-124, 1977) 及びLangerなど (*Biochem. Pharmacol.* 23: 1793-1800, 1974) はさらに、これらのクラスを $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及び $\beta 1$ 、 $\beta 2$ に分けた。Land (前記) は、 $\beta 1$ レセプターを、心臓刺激及び脂肪分解に対して応答する β -アドレナリンレセプター (βAR としてここで言及される) として及び $\beta 2$ レセプターを、アドレナリン気管支拡張及び血管拡張を仲介する βAR として命名した。

βAR に対するリガンドは、過敏症、ショック、低血圧、心臓性ショック、ぜん息、早期、アングナ、高血圧、心臓不整脈、片頭痛及び甲状腺機能亢進の処置に使用される。

Gタンパク質結合レセプターに対するリガンドは治療剤として可能性はあるが、これらの化合物のスクリーニングは困難且つ労力がかかる。現在、リガンド結合は、放射性リガンド結合方法 (Leffkowitzなど、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 703-709, 1974; Aurbach など、*Science* 186: 1223-1225, 1974; Atlas など、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4246-4248, 1974) を用いて測定さ

れる。可能性ある作用薬は、膜成分又は応答性細胞に放射性ラベルされた物質を結合することによって、放射性リガンド結合方法を用いて直接的にアッセイされ得る。過剰ラベルが除去された後に残存する放射能の量は、レセプターに結合される物質の尺度である。信託量は、細胞表面レセプターのために既知のラベルされた作用薬と競争するそれらの能力によりスクリーンされ得、従って、膜又は細胞表面に結合される放射能の量を減じる。BARの場合、この方法は、まず、応答性組織又は細胞系からの換えられていない膜の単離を包含する。しばしば、ある限定されたサブセットの細胞のみが特定の物質に反応し(Lefkowitzなど、Ann. Rev. Biochem. 52: 159-186, 1983)、そしてそのような細胞は培養での増殖が困難であり、又は少数のレセプターを有し、アッセイをやっかいにする。さらに、哺乳類細胞は、いづれか1種の特定のクラスのレセプターについてのリガンドスクリーニングを困難にする種々のGタンパク質結合レセプタークラスを同時発現する。現在のアッセイシステムは、労力がかかり、そして自動化及び高い処理量のスクリーニングアッセイに役に立たない。レセプターの源としての培養された哺乳類の細胞の使用は、困難且つ費用がかかる。

ヒトBARはE. コリ (*E. coli*) に発現されるが(Marulloなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7551-7555, 1988; 及び Marulloなど、Bio/Technology 7: 923-927, 1989)、レセプター発現のレベルはひじょうに低く、そしてリガンド結合アッセイは、哺乳類細胞のために使用される複製段階の労力のかかる放射性リガンドアッセイに制限される。それ自体、それらの形質転換された細胞は、商業規模の高い処理量のリガンドスクリーニングのために有用でない。従って、Gタンパク質結合レセプターを通して高等真核細胞に対して作用できる化合物の高い体積のスクリーニングを可能にするア

ッセイシステムについての必要性が、当業界において存在する。そのようなシステムは、急速であり、安価であり、そして高い体積のスクリーニングに適合できるべきである。本発明は、そのようなアッセイシステムを提供し、そしてさらに、他の関連する利点を提供すること。

発明の要約

手短かに言及すれば、本発明は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列を開示する。これらのハイブリッドGタンパク質結合レセプターは、適切な宿主細胞中で発現される場合、標準的方法を用いて、哺乳類Gタンパク質結合レセプターに対する可能性あるリガンドのスクリーニングを可能にする。本発明はまた、単一の細胞タイプを用いて、試験物質におけるリガンドの存在を完全に検出するための種々の方法を提供し、従って、当業界においてこれまで利用できなかった簡便化された検出方法を提供する。本発明の宿主細胞は、容易に培養される追加の利点を提供し、そして容易にモニターされる態様でリガンドに反応する。

本発明の1つの観点においては、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列が開示され、ここで前記レセプターは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る。本発明の1つの態様において、酵母Gタンパク質結合レセプターは、サッカロミセス セレビスシアエ *S T E 2* (*Saccharomyces cerevisiae*) 遺伝子生成物、サッカロミセス セレビスシアエ *S T E 3* 遺伝子生成物及びサッカロミセス クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) *S T E 2* 遺伝子生成物から成る群から選択される。好ましい態様に

おいて、酵母Gタンパク質結合レセプターは、サッカロミセス セレビスシアエ *S T E 2* 遺伝子生成物である。本発明のもう1つの態様において、哺乳類Gタンパク質結合レセプターは、 β -アドレナリンレセプター、 α -アドレナリンレセプター、ムスカリンレセプター、アンギオテンシンレセプター、物質Kレセプター及びロドプシンレセプターから成る群から選択される。1つの態様において、そのDNA配列は、ハイブリッド哺乳類Gタンパク質結合レセプターをコードし、ここで細胞外アミノ末端ドメインの一部、エフェクタードメイン、第3内部エフェクタードメイン及びカルボキシ末端内部エフェクタードメインから少なくとも成る群から選択された哺乳類Gタンパク質結合レセプタードメインは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換される。本発明のもう1つの態様において、そのDNA配列は、ハイブリッド哺乳類Gタンパク質結合レセプターをコードし、ここで哺乳類Gタンパク質結合レセプターの細胞外アミノ末端及びエフェクタードメインから成る群から選択された哺乳類Gタンパク質結合レセプタードメインは、酵母Gタンパク質結合レセプターの細胞外アミノ末端及びエフェクタードメインにより置換される。さらにもう1つの態様において、そのDNA配列は、ハイブリッド哺乳類Gタンパク質結合レセプターをコードし、ここでカルボキシ末端内部エフェクタードメイン、第3内部エフェクタードメイン、及びカルボキシ末端内部エフェクター及び第3内部エフェクタードメインから成る群から選択された哺乳類Gタンパク質結合レセプタードメインは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換される。

本発明のもう1つの観点は、酵母細胞において生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体に向けられ、次の操作的に連結された要素を

含んで成る：低等プロモーター；生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列、ここで前記レセプターは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成り；及び転写ターミネーター。

関連する観点において、本発明は生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞を開示し、ここで前記レセプターは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る。好ましい態様において、酵母細胞はサッカロミセス セレビスシアエ 細胞である。特に好ましい態様において、酵母宿主細胞は、遺伝的にBAR1 遺伝子を含まないサッカロミセス セレビスシアエ 半致死性細胞である。本発明のもう1つの態様において、酵母宿主細胞は、インジケーターDNA配列に操作的に結合されるBAR1 プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体により形質転換される。そしてここで、前記第2 DNA構造体はBAR1 遺伝子座で結ばれる。好ましい態様において、前記インジケーターDNA配列はlacZ コード配列である。

本発明は、試験物質におけるリガンドの存在を検出するための方法を開示する。本発明の方法は、a) 酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞（酵母宿主細胞は前

記生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターを発見する)の培養物を、前記ハイブリッドGタンパク質結合レセプターへのリガンドの結合を可能にするための適切な条件下で試験管に暴露し;そしてb)宿主細胞の生物学的応答を決定し、そしてそれから、リガンドの存在を決定する段階を含んで成る。本発明の1つの態様において、宿主細胞はまた、インジケーターDNA配列に操作性に結合されるBARR1プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体により形質転換され、そして前記検出の段階は、前記インジケーターDNA配列の発現を検出することを含んで成る。好ましい態様において、前記方法は、E. コリの1302コード配列に操作性に結合されるBARR1プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体(第DNA構造体はBARR1遺伝子座で転写される)により形質転換されたラッカロミセス セレビシエ半致死性細胞である宿主細胞をさらに含んで成る。本発明の1つの態様において、本発明の方法は、適切な固体を増殖培地の上部の寒天層に懸濁される宿主細胞をさらに含んで成る。関連する本発明の観点において、前記寒天層は1又は複数のウェルを含み、そして暴露する段階は、試験物質によるウェルの充填を含んで成る。本発明のもう1つの態様において、暴露の段階は、寒天層上への試験物質により飽和されたフィルターの配置を含んで成る。1つの好ましい態様においては、前記方法は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換されたラッカロミセス セレビシエ複製型半致死性細胞である宿主細胞を含んで成り、ここで前記レセプターはSTE2遺伝子生成物の対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成り、そして前記検出段階は細胞分裂のG1相において分裂停止さ

れた輪状宿主細胞の存在を検出することを含んで成る。本発明のもう1つの態様において、本発明の方法は、適切な固体増殖培地の上部の寒天層において作用薬と共に懸濁された宿主細胞の培養物を含んで成る。本発明の好ましい態様において、本発明の方法は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換されたラッカロミセス セレビシエ複製型半致死性細胞を含んで成り、ここで前記レセプターは、適切な固体増殖培地の上部の寒天層において作用薬と共に懸濁された、STE2遺伝子生成物の対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成り、そして前記検出段階は、輪状宿主細胞コロニーの存在を検出することを含んで成る。

本発明の他の観点は、次の詳細な説明及び図面から明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

第1図は、代表的なGタンパク質結合レセプターの構造を示す。使用される記号は、次の通りである:点線により囲まれるEATD、すなわち細胞外アミノ末端ドメイン;実線により囲まれるLBD、すなわちリガンド結合ドメイン;ダッシュラインにより囲まれるED、すなわちエフェクタードメイン;1-1D、すなわち第1内部エフェクタードメイン;2-1D、すなわち第2内部エフェクタードメイン;3-1D、すなわち第3内部エフェクタードメイン;C-1D、すなわちカルボキシ末端内部エフェクタードメイン;L2、すなわち第1外部リガンド結合ドメイン;L4、すなわち第2外部リガンド結合ドメイン;L6、すなわち第3外部リガンド結合ドメイン;TMD1、すなわち第1トランスメンブランドメイン;

TMD2、すなわち第2トランスメンブランドメイン;TMD3、すなわち第3トランスメンブランドメイン;TMD4、すなわち第4トランスメンブランドメイン;TMD5、すなわち第5トランスメンブランドメイン;TMD6、すなわち第6トランスメンブランドメイン及びTMD7、すなわち第7トランスメンブランドメイン。

第2図は、代表的なSTE2クローンpAH1、pAH2、pAH3及びSTE2-SubP #6の一部の制限地図を示す。使用される記号は次の通りである:B、BamHI;E、EcoRI;H、HindIII;P、PstI;Pv、PvuII;S、SalI;X、XbaI;subP、物質P。開放ボックスは、ベクター配列を示し、斜線を引かれたボックスはM13mp8ベクター配列を言及する。

第3図は、代表的なハムスターGタンパク質結合レセプター、すなわちハムスター β 。ARをコードするヌクレオチド配列及びそのタンパク質の推定されるアミノ酸配列を示す。線上の数字は、成熟タンパク質のヌクレオチド配列を言及する。ボックス内の配列は、第2及び第3外部リガンド結合ドメインを言及する。記号L2及びL4は、それぞれ第1、第2及び第3外部リガンド結合ドメインを言及する。

第4図は、プラスミドpHRS6の構成を示す。使用される記号は、第1図におけるのと同じであり、そしてSTE2は、ラッカロミセス セレビシエ STE2ゲノム配列を示す。

第5図は、プラスミドpHRS5の構成を示す。使用される記号は、第1図におけるのと同じであり、そしてSTE2、すなわちラッカロミセス セレビシエ STE2ゲノム配列;subP、すなわち物質P C-末端ペンタペプチドダイマーコード配列を示す。

第6図は、プラスミドpHRS9の構成を示す。使用される記号

は、第1図の通りであり、そしてSTE2、すなわちラッカロミセス セレビシエ STE2ゲノム配列;subP、すなわち物質P C-末端ペンタペプチドダイマーコード配列を示す。

第7図は、代表的なヒトGタンパク質結合レセプター、すなわちヒト β 。ARをコードするヌクレオチド配列及びそのタンパク質の推定されるアミノ酸配列を示す。線上の数字は、成熟タンパク質のヌクレオチド配列を言及する。配列上の実線は、推定上のトランスメンブランドメインを言及する。使用される記号は、第1図の通りである。

第8図は、プラスミドpHRS11の構成を示す。

第9図は、代表的な酵母Gタンパク質結合レセプター、すなわちラッカロミセス セレビシエ STE2遺伝子をコードするヌクレオチド配列及びそのタンパク質の推定されるアミノ酸配列を示す。線上の数字は、成熟タンパク質のヌクレオチド配列を言及する。配列上の実線は、推定上のトランスメンブランドメインを言及する。使用される記号は、第1図の通りである。

第10図は、エビネフリン及びノルエビネフリンについての代表的な競争結合曲線を示す。

第11図は、インプロテレンールについての代表的な競争結合曲線を示す。

発明の詳細な説明

本発明を記載する前に、本明細書に用いられる一定の語の定義を記載することが本発明の理解に役立つであろう。

生物学的活性:生物学的背景(即ち、生体又はその試験管内模写)における分子によって示される機能又は一定の活性。生物学的活性は応答性細胞系からの細胞外マトリックス分泌の誘発、ホルモン分

逆の誘発、定化性の誘発、分化の誘発、又は応答性細胞の細胞分裂の阻止を含む。組織タンパク質は、もしそれが天然の対応物の1もしくは複数の生物学的活性を示すなら、生物学的に活性であると考えられる。

レセプターはもしそれがリガンドと結合できる、シグナルを発することができる、そして細胞応答を誘発できるなら生物学的に活性であると考えられる。例えば、リガンド結合性ドメイン以外のドメインが対応の酵母フェロモンレセプターによって置き代っている酵母より発現された哺乳類ハイブリッドGタンパク質-結合レセプターは、もしそれがリガンドと結合でき、そして交配応答経路を誘発し、この酵母宿主細胞のG1保存をもたらすならば、それは生物学的に活性である。

リガンド: レセプターのリガンド-結合性ドメインに結合できる分子。該分子は化学的に合成されても、天然であってもよい。

ドメイン: タンパク質又はペプチドの一部であって、このタンパク質又はペプチドのその他の部分から物理学的もしくは機能的に区別される部分である。物理学的に規定されるドメインは、特に疎水性又は親水性であるようなアミノ酸配列、例えば膜結合する又は細胞質結合するような配列を含む。ドメインは更に、例えば遺伝子重複により生ずる内部相同性により規定されうる。機能的に規定されるドメインは固有の(複数の)生物学的機能を有する。レセプターの結合性ドメインは例えばリガンドに結合するドメインである。機能的に規定されるドメインは連続するアミノ酸配列によってコード化される必要はない。機能的に規定されるドメインは1もしくは複数の物理学的に規定されるドメインを含む。レセプターは例えば、一般的にリガンド結合性ドメインとエフェクタードメインに分かれる。Gタンパク質結合レセプターは一般的に細胞外アミノ-

末端ドメイン、リガンド結合性ドメイン及びエフェクタードメインに分けられる。

前記した通り、高等真核細胞の種々の生物学的応答がGタンパク質結合レセプターによって仲介される。これらのレセプターに対するリガンドは種々の症状を治療するために用いられる。潜在的なGタンパク質結合レセプターリガンドをスクリーニングするための現状有用な方法は費用がかかり、労力が大変であり、そして応答性組織又は細胞系からの膜フラグメントの単離の必要性によって制限される。

本発明はハイブリッドGタンパク質-結合レセプターを提供する。これらのハイブリッドレセプターは、リガンド結合性ドメイン以外の少なくとも1種のドメインが、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応のドメインによって置き代っている哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る。本発明は更に、DNA構造物であってこのようなDNA配列の発現を誘導することができるもの、このようなDNA構造物により形質転換されている真核細胞、及びこのような細胞を用いたリガンド結合性をアッセイするための方法を提供する。本発明は従ってまだ知られていない種-交差ハイブリッドGタンパク質結合レセプターを提供する。

図解に限定されたいは、Gタンパク質結合レセプターは第1図に示す一般構造を有するものと考えられる。このようなレセプターは細胞外アミノ末端ドメイン、リガンド結合性ドメイン及びエフェクタードメインを含んで成る(第1図)。鳥類と哺乳類の β -アドレナリンレセプターcDNA (Yardenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 6795-6799, 1986; Dixonら、Nature **321**: 75-79, 1986; 及び Mobilkaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 46-50, 1987)、牛ロドプシンcDNA (Nathans and Bogness, Cell **34**:

807-814, 1983)、 α -アドレナリンレセプター(Mobilkaら、Science **228**: 650-656, 1987)、アンギオテンシンレセプターcDNA (Yosangら、Cell **45**: 711-719, 1986; Jacksonら、Nature **335**: 437-439, 1988)、牛K物質レセプター (Masuら、Nature **329**: 836-838, 1987)、及びムスカリン性アセチルコリンレセプターcDNA (Kuboら、Nature **323**: 411-416, 1986)の比較は、6種全てのタンパク質が第1図に示す構造を共有していることを予測させる(参考として、Lefkowitzら、J. Biol. Chem. **263**: 4993-4996, 1988; Panayotov and Waterfield, Curr. Opin. Cell Biol. **1**: 167-176, 1989を参照のこと)。

本明細書で用いているGタンパク質結合レセプターのリガンド結合性ドメインは、第1図にLBDとして示す、リガンドの結合に関与し、且つ一般的にはトランスメンブランドメイン(TMD)及びそれに結合している細胞外リガンド結合性ドメインを含むレセプターの部分を含んで成るレセプターの部分である。Gタンパク質結合レセプターの構造は、その一次翻訳生成物から例えばP/C Gene又はIntelligenetics Suite(Intelligenetics, Mt. View, CA)の疎水性プロット図解を用いて推測するか、又は例えばKyteとDoolittleのJ. Mol. Biol. **157**: 105-132に詳細の方法に従って推測されうる。例えば β -アドレナリンレセプターのリガンド結合性ドメインは少なくとも第3、第5及び第7のトランスメンブランドメインを必要とすることが示されている(Dixonら、Nature **326**: 73-77, 1987; Straderら、J. Biol. Chem. **263**: 10267-10271, 1988; Straderら、J. Biol. Chem. **264**: 13572-13578, 1989)。図1にEDとして示すGタンパク質結合レセプターのエフェクタードメインは、リン酸化されることがあり、そして結合したGタンパク質の相互作用において並びにレセプターリガンド複合体の脱離、順応、インターナ-

リゼーション及びリサイクルのメカニズムに関与するGタンパク質結合レセプターのドメインである。エフェクタードメインは、連続である必要がなく、そして第1、第2、第3及び/又はカルボキシ末端内因性エフェクタードメイン(第1図にそれぞれ1-1D, 2-1D, 3-1D及びc-1Dとして示す)を含むようなアミノ酸配列によってコードされるものと理解される。例えばDixonら(前記, 1987)は、ヒト β , ARのエフェクタードメインが第3の内因性ドメインを含むと提案している。

本発明はGタンパク質結合レセプターを介する刺激に応答する真核細胞の能力を利用する。本発明の一態様において、例えば、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列が酵母宿主細胞において発現されたとき、この宿主細胞は、Gタンパク質結合レセプターリガンドに対する酵母生物学的応答を介して結合且つ応答する(そうでなければこのような応答は誘発されない)。このような応答の代表例は酵母細胞の交配フェロモンへの応答である。酵母サッカロミセス セレビシア及びサッカロミセス クルイペリは外因性交配フェロモン α -因子及び α -因子に応答性である。サッカロミセス セレビシア及びサッカロミセス クルイペリのMAT α 細胞は、 α -因子レセプターである示されている。STE2遺伝子生成物が発現する(Jensenら、Cell **35**: 521-529, 1983; Nakayamaら、EMBO J. **4**: 2643-2648, 1985; Burkholder and Hartwell, Nuc. Acids Res. **13**: 8463-8475, 1985; Narah and Herakowitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 3855-3859, 1988)。サッカロミセス セレビシア MAT α 細胞は α -因子レセプターであると示されているSTE3遺伝子生成物が発現する(Nakayamaら、EMBO J. **4**: 2643-2648, 1985; Bogenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 1418-1422, 1986)。これらの推測のレセプターが伸

介する細胞応答によるメカニズムは明らかにされていないにもかかわらず、これらのレセプターはC-タンパク質に結合されるものと一般に考えられている (Whitewayら, *Cell* 55: 467-477, 1989; Herskowitz and Marsh, *Cell* 50: 995-996, 1987)。交配フェロモンのその個々のレセプターへの結合は交配フェロモン応答経路を活性化する。この応答経路はある程度 SCG1, STE4 及び STE18 遺伝子生成物によって仲介され、そして交配型特異的遺伝子及びアグルチニン遺伝子の転写誘発、並びにG1期の細胞分裂における細胞を拘束することをもたらす。本発明はハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列であって、酵母宿主細胞によって発現されるとき、宿主細胞がGタンパク質結合レセプターリガンドと結合且つ応答する(そうでなければ酵母交配応答は誘発されない)ことを可能とするDNA配列を利用する。

ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列は、哺乳類Gタンパク質結合レセプターのリガンド結合性ドメイン以外の少なくとも1種のドメインをコードするDNA配列を、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応のドメインをコードするDNA配列によって置き換えるための、制限酵素分解、エキソスクレアゼ分解及びリゲーションの標準的技術を用いるクローン化レセプターDNAから調製するか、又は例えばZoller and Smith (*DNA* 3: 479-488, 1984) もしくはKunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492, 1985)を用いる試管内突然変異誘発によって調製することができる。ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列の一例は、ハイブリッドヒト β ARであってそのアミノ末端細胞外ドメインがサッカロミセス セレビスシアエ STE2 遺伝子生成物のアミノ末端細胞外ドメインによって置き代っているものをコードする。ハイブリッドGタンパク質結合レセプター

ンパク質結合レセプターをコードするクローン化ゲノムもしくはcDNAに対する相関性、又は該レセプターに特異的な抗体を用いることにより単離される。他方、cDNAライブラリーは発現性ベクターへと作製することもでき、そしてG-タンパク質結合レセプターDNAは該Gタンパク質結合レセプターを発現する細胞の同定によって単離化される。哺乳類Gタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列は標準的技術を用いて合成することもできる。一般に、cDNA配列が本発明の実施のために好ましく、なぜならこれは、特に酵母における異常なRNAプロセッシング及び低い発現レベルをもたらすような介在配列がないからである。 β :ARをコードする相補性DNAは、例えば標準的な実験室工程に従って胎盤細胞から調製したライブラリーから得ることができ、そして既知の β :ARのゲノム又はcDNA配列を用いてスクリーンされる。もし部分的クローンが得られたなら、エンドヌクレアゼ切断、リゲーション及びブルーアウト突然変異誘発のような技術を用いて、それらを適切な解説枠において連結して全長クローンを作ることが必要とされる。

酵母Gタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列も詳細されている。例えばサッカロミセス セレビスシアエ STE2 遺伝子 (Nakayamaら, *EMBO J.* 4: 2643-2648, 1985; Burkholder and Hartwell, *Mol. Acids Res.* 13: 8463-8475, 1985)、サッカロミセス セレビスシアエ STE3 遺伝子 (Nakayamaら, *EMBO J.* 4: 2643-2648, 1985; Hagenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1418-1422, 1986及びHagenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1418-1422, 1986) 及びサッカロミセス クルイペリ STE2 遺伝子 (Marsh and Herskowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3855-3859, 1988) が詳細されている。酵母Gタンパク質結合レセプター

をコードするDNA配列の他の典型例は、ハイブリッドヒト β ARであってそのカルボキシ末端内因性エフェクタードメインがサッカロミセス セレビスシアエ STE2 遺伝子生成物のカルボキシ末端内因性エフェクタードメインによって置き代っているものをコードする。ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列の他の典型例は、ハイブリッドヒト β ARであって、そのアミノ末端細胞外とカルボキシ末端内因性エフェクタードメインが、サッカロミセス セレビスシアエ STE2 遺伝子生成物のアミノ末端細胞外とカルボキシ末端内因性エフェクタードメインによって置き代っているものをコードする。ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列の他の典型例は、ハイブリッドヒト β ARであってそのアミノ末端細胞外ドメイン、第3内因性エフェクタードメイン及びカルボキシ末端内部エフェクタードメインが、サッカロミセス セレビスシアエ STE2 遺伝子生成物のアミノ末端細胞外ドメイン-第3内因性エフェクタードメイン及びカルボキシ末端内部エフェクタードメインによって置き代っているものをコードする。

ヒト β :AR (Kobilkaら、前記)、ヒト β :AR (Friedleら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7920-7924, 1987)、ハムスター β :AR (Olsonら、前記、1986)、七面鳥 β AR (Yardenら、前記)、ロドプシンレセプター (Mathhams and Hogeness、前記)、 α - α -アドレナリンレセプター (Kobilkaら、前記、1987)、アンギオテンシンレセプター (Youngら、前記; Jacksonら、前記)、K物質レセプター (Naseら、前記) 及びムスカリン性アセチルコリンレセプター (Kuboら、前記) をコードする相補性DNAが詳細されている。他方、これら及びその他のGタンパク質結合レセプターDNAは、適切な細胞系から調製されたcDNAからクローンされ、そしてGタ

をコードするDNA配列は、形質転換及び相補の標準的な相補技術を用いて酵母の株から調製したDNAライブラリーからクローン化される。サッカロミセス セレビスシアエ STE2 遺伝子は、例えばste2 突然変異を有するサッカロミセス セレビスシアエ 株を形質転換させるため、野生型酵母細胞から調製したDNAライブラリーを用いてクローン化することができる。このste2 突然変異を相補することができるDNA配列は酵母宿主細胞が交配することを可能にするであろう。

ハイブリッドレセプター融合体をコードするDNA配列を、発現性真核細胞、例えば酵母のための適切な発現性ベクターに入れる。適切な酵母発現性ベクターには、YRp7 (Struhlら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039)、YE p13 (Broachら、*Gene* 8: 121-133, 1979)、pJDB248及びpJDB219 (Bezaa、前記) 並びにそれらの誘導体が含まれる。このようなベクターには一般に選択マーカー、例えば栄養マーカーLEU2 が含まれ、これはleu2 突然変異を保存する酵母宿主株における選別を可能にする。利用される他の選択マーカーは、Kawasaki 及び Bell (BP 171,141) に詳細のPOT1遺伝子であり、これはグルコースの存在下において宿主細胞が増殖できなくなるpil1 突然変異誘発の相補を可能にする。

酵母発現ベクターにおける好ましいプロモーターには、サッカロミセス セレビスシアエ のSTE2及びSTE3遺伝子 (Hartigら、*Mol. Cell. Biol.* 5: 2106-2114, 1986; Nakayamaら、前記)、サッカロミセス セレビスシアエ 解糖遺伝子 (Witzemanら、*J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080, 1980; Alber and Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434, 1982) 又はサッカロミセス セレビスシアエ アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (Youngら、*Somatic Engine-*

Principles of Microorganisms for Chemicals, Hollanderら (編) 頁 335, Plenum, New York, 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101: 192-201, 1983) 由来のプロモーターが含まれる。特に好ましいプロモーターは、サッカロミセス セレビシアエ T P I I プロモーター (Alber and Kawasaki 前記; Kawasaki, 米国特許第 4,599,311号) である。更に、転写終止シグナル、例えば T P I I ターミネーターを発現性ベクター内に含むことが好ましい。

多くの真核細胞が本発明に使用され得る。本発明を実施するための好ましい真核宿主細胞は酵母の株である。酵母を形質転換するための技法は、文献において良く知られており、そしてたとえば、Boggs (Nature 275: 104-108, 1978) 及び Hinnen など、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933, 1978) により説明されている。本発明に使用するための特に好ましい酵母宿主細胞は、サッカロミセス セレビシアエ の株である。本発明の1つの態様において、MAT_a であり、そして遺伝的な S T E 2 遺伝子生成物を生成しない サッカロミセス セレビシアエ 細胞が、宿主細胞として使用される。好ましい態様において、サッカロミセス セレビシアエ 宿主細胞は、S T E 2 遺伝子のいくらか又はすべての欠失を含む MAT_a 細胞である。本発明のもう1つの態様において、サッカロミセス セレビシアエ 宿主細胞は、B A R I 遺伝子に遺伝子欠失を含む MAT_a 細胞である。本発明の好ましい態様において、サッカロミセス セレビシアエ 宿主細胞は、B A R I 遺伝子の欠失を含む MAT_a 細胞である。本発明の特に好ましい態様において、サッカロミセス セレビシアエ 宿主細胞は、S T E 2 遺伝子の欠失及び B A R I 遺伝子の欠失を含む MAT_a 細胞であり、ここで B A R I プロモーターに操作性に結合される E. コリ 1 a c 2 遺伝子は、B A R I コード領域のいくらか又はすべてを置換する。適切な宿主株は、American

Type Culture Collection, Rockville, Maryland 及び Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California から得られ、又は標準の突然変異誘発技法を用いて調製され得る。遺伝子座を含む酵母宿主株は、たとえば Boebats (Meth. Enzymol. 101: 202-211, 1983) により実質的に記載される方法により調製され得る。

形質転換された酵母宿主細胞は、選択可能マーカーの存在について選択することによって得られる。一般的に、形質転換された細胞の選択は、プラスミド上に存在する選択可能マーカーによる宿主の遺伝子欠失の相補性により達成される。遺伝的に 1 e u 2 であり、そして 1 E U 2 マーカーを担持するベクターにより形質転換される酵母宿主細胞は、一般的にアミノ酸ロイシンを欠く選択媒体において増殖される。

選択の後、細胞は、対象の遺伝子が発現し始めるために適切な増殖媒体において増殖せしめられる。本明細書において使用される場合、用語「適切な増殖媒体」とは、形質転換された細胞の選択及び増殖、及びハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列の発現のために必要とされる栄養物及び他の成分を含む媒体を意味する。媒体は一般的に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖、ビタミン及び塩を含む。媒体の必要成分は、特に宿主株のためにいく分、変化するであろう。適切な媒体の選択は、当業者のレベル内である。1つの態様において、媒体は5-ブローモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド (X-gal) により補充され、そして媒体のpHは、6、8-7、0のpHで維持される。適切なpHは媒体を透過することによって維持される。適切な緩衝剤は、琥珀酸、Bis-Tris (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 及びリン酸カリウムである。X-gal は好ましくは、4.0 mg/ml の濃度で補充される。多くの場合、固体増殖媒体が必要とされる。適

切な固体増殖媒体は、1%~3%、好ましくは2%の寒天により媒体を補充することによって、いづれか適切な増殖媒体のために調製され得る。固体増殖媒体は一般的に、加熱殺菌の前、増殖媒体に寒天を添加することによって調製される。他方、固体増殖媒体は、無菌の増殖媒体に溶融寒天を添加することによって調製され得る。

ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列を含んで成るDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞は、試験物質におけるリガンドの存在を検出するための種々の方法に使用され得る。これらのアッセイは、一般的にa) 酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞（該宿主細胞は前記生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターを発現する）の培養物を、前記ハイブリッドGタンパク質結合レセプターへのリガンドの結合を可能にするための適切な条件下で試験サンプルに曝露し；そしてb) 宿主細胞の生物学的応答を決定し、そしてそれから、リガンドの存在を決定する段階を含んで成り、ここで測定は検出の手段である。

レセプターへのリガンドの結合を可能にするための適切な条件は、生理学的条件であり、ここでpHは6-8に維持され、そして温度は20℃~40℃である。好ましくは、pHは7、4-7、5の間で維持され、そして温度は22℃~23℃の間である。本明細書で使用される場合、レセプターへのリガンドの結合は、レセプターの位相学におけるコンホメーション変化をもたらす、レセプターのリガンド結合ドメインと分子との相互作用を示すことが理解される。レセプターへのリガンドの結合は、検出可能な生物学的応答を引き起こ

す又は阻止するかのいずれかである。本発明に使用するための適切な生物学的応答は、結合する能力、アグルチニンの生成及びアデニレートサイクラーゼ活性化を包含する。特に好ましい生物学的応答は、細胞分裂のG1相における細胞分裂停止である。

1つの態様において、本発明の方法は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換された酵母細胞の培養物（ここで、前記レセプターは酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る）が適切な固体増殖媒体の上部の寒天層に懸濁されることを含んで成る。前記寒天層は好ましくは、0、6-2、5%、より好ましくは0、7%の寒天である。寒天は、適切な固体増殖媒体で希釈されても又はされなくても良い。試験物質を含む溶液がアッセイプレートのウェルに添加される。他方、試験物質により飽和されたフィルターが、寒天層の表面上に被覆される。試験物質は寒天層を通して拡散し、そして生物学的応答を含む、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターに結合する。輪状の応答細胞は、試験物質が作用面を含むことを示す。

拮抗薬は、既知の作用薬により処理された細胞のG1停止を逆転し又は妨げるそれらの能力により検出される。1つの方法において、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成るハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞（該宿主細胞は前記ハイブリッドGタンパク質結合レセプターを発現する）が、適切な固体増殖媒体の上部の寒天層において作用薬と共に懸濁される。作用薬

は、宿主細胞の生物学的応答を含む。試験物質は、アッセイプレートウェル中に配置され又は寒天の上部に被覆されるフィルター上に飽和される。試験物質は培地を通して拡散し、そしてハイブリッドGタンパク質結合レセプターへの結合のために作用薬と競争する。洗じられた生物学的応答を有する輪状細胞のコロニーは、試験物質が拮抗薬を含むことを示す。他の方法においては、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成るハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換された酵母宿主細胞（該宿主細胞は前記ハイブリッドGタンパク質結合レセプターを発現する）が、適切な固体増殖培地の上部の寒天層に懸濁される。試験物質は作用薬と共に混合され、そしてアッセイプレートウェル中に配置され、又は寒天層の上部に被覆されるフィルター上に飽和される。試験物質は培地を通して拡散し、そして試験物質は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターへの結合のために作用薬と競争する。作用薬のみに曝露される宿主細胞の生物学的応答に対して洗じられた生物学的応答を示す輪状細胞は、試験物質が拮抗薬を含むことを示す。

好ましい態様において、試験物質におけるリガンドの存在は、レセプターとの結合のために作用薬と競争する拮抗薬の能力又は酵母対合応答を誘導する作用薬の能力に基づいて検出される。特に好ましい態様においては、本発明の方法は、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体

たらず。

本発明の特に好ましい態様においては、試験物質におけるリガンドの存在を検出するための方法は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターの発現を方向づけることができるDNA構造体により形質転換されたサッカロミセス セレビスシアエ接合型 α 非致性宿主細胞の培養物を利用し、ここで前記レセプターは、STE2遺伝子の対応するドメインにより置換されたリガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成り、そして前記酵母宿主細胞は、E. コリ lacZコード配列に操作的に結合されるBAR1プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体がBAR1配列の一部又はすべての宿主細胞ゲノム中への置換をもたらすBAR1遺伝子座で組込まれるようにその第2 DNA構造体により形質転換される。その方法は、(a) 形質転換された宿主細胞の培養物を、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターへのリガンドの結合を可能にする適切な条件下で試験物質に曝露し、そして生成される β -ガラクトシダーゼのレベルを測定することによってBAR1プロモーターの誘発を検出する段階を含んで成る。本発明の1つの態様において、 β -ガラクトシダーゼ発現は、宿主細胞培養物における β -ガラクトシダーゼによる色原体基質の分解に起因する黄色の分解生成物 α -ニトロフェノールの生成を測定することによって検出される。もう1つの態様において、宿主細胞は、寒天上部においてローンとして懸濁され、そして6.8~7.0の間のpHに緩衝され、そしてX-galにより補充された適切な増殖培地を含んで成る培地のプレート上に注がれる。その培地は、Bis-Tris(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.)により緩衝化される。試験物質を含む溶液はアッセイプレートウェルに添加され、又は試験物質により飽和されたフィルターが寒天層の表面

により形質転換されたサッカロミセス セレビスシアエ宿主細胞（該宿主細胞は前記生物学的に活性なハイブリッドGタンパク質結合レセプターを発現する）が、インジケーターDNA配列に操作的に結合される接合型の特異的プロモーターを含んで成る第2 DNA構造体によりまた形質転換される。この方法においては、宿主細胞は、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターへのリガンドの結合を可能にするための適切な条件下で試験リガンドに曝露され、そしてレセプターへのリガンドの結合は、インジケーターDNA配列の発現を検出することによって検出される。接合型の特異的遺伝子プロモーターは、サッカロミセス セレビスシアエ BAR1遺伝子、サッカロミセス セレビスシアエ MP α 1遺伝子、サッカロミセス セレビスシアエ STE3遺伝子、サッカロミセス セレビスシアエ STE2遺伝子、サッカロミセス クルベイリ遺伝子、サッカロミセス セレビスシアエ AG α 1遺伝子、サッカロミセス セレビスシアエ SST2遺伝子及びサッカロミセス セレビスシアエ FUS1遺伝子を包含する。本発明に使用するのための特に好ましい接合型の特異的プロモーターは、BAR1プロモーターである。インジケーターDNA配列は、発現が宿主細胞による検出可能な生物学的応答をもたらすDNA配列を含む。適切なインジケーターDNA配列は、栄養要求性宿主細胞を補う栄養性マーカーをコードするDNA配列、耐抗生物質性をコードするDNA配列及び色原体物質を切断することができる酵素をコードするDNA配列を包含する。特に好ましいDNA配列は、E. コリ lacZ遺伝子である。

特に好ましい態様において、BAR1プロモーターは、E. コリ lacZ遺伝子に操作的に結合される。DNA構造体は好ましくは、酵母ゲノムにおけるBAR1遺伝子座で組込まれ、内因性BAR1コード配列のいくらか又はすべてとそのDNA構造体との置換をも

上に被覆される。試験物質は軟寒天層を通して拡散し、そしてハイブリッドGタンパク質結合レセプターに結合し、 β -ガラクトシダーゼ発現の誘発を引き起こす。リガンド結合は、 β -ガラクトシダーゼによるX-galの分解から生成される濃い青色のジプロモジクロロインジゴの生成に起因する輪状の青色細胞を同定することによって検出される。青色のコロニーは、試験物質が効果的な作用薬であることを示す。

次の例は、例示的であって、本発明を限定するものではない。

実 験

例1—サッカロミセス セレビスシアエ STE2遺伝子のクローニング

STE2遺伝子を、Hartls (Mol. Cell. Biol. 6: 2106~2114, 1986) により記述しているようにして得た。手短に言及すれば、Nessyith及びYatchell (Cell 19: 753~754, 1980) により記載されているようにして調製された、ベクターYEp13に全体の酵母ゲノムフラグメントを含むDNAライブラリーを、2種のleu2酵母株中に形質転換し、ここで前記2種の酵母株のそれぞれは、ste2変異を含み、そして接合できない。形質転換された細胞を、ロイシンを欠く合成完全培地上での選択により単離した。Leu⁺コロニーを、接合する能力についてスクリーンした。接合する能力を獲得した6個のコロニーを同定した。6個のコロニーのうち、5個のコロニーは、ste2変異を補うことができる異なるプラスミドを有することが見出された。2.8 Kbの長さであることが見出された共通領域は、プラスミドpAH1及びpAH3に示された（第2図）。pAH1からの2.8 KbのPst1-BamHIフラグメントを、酵母ベクターpZUC12 (Hogene Hansen, Novo-Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) 中にサブクローンし、ここで前

記ベクターは、サッカロミセス セレビシアエ LEU2 遺伝子及び E. コリ プラスミド pUC12 における サッカロミセス セレビシアエ 2 μ m プラスミドからの複製の起点を含んで成る。得られたプラスミドにより形質転換された サッカロミセス セレビシアエ leu2 宿主細胞は、接合であることが見出され、これは、pAH1 からの 2.5 kb の挿入体が STE2 構造遺伝子を含むことを確認した。クローンされた遺伝子の同一性を、宿主ゲノム中への組み込み及び狭くサザンハイブリダイゼーションにより、さらに確認した。プラスミド pAH1 の約 2 kb のフラグメントを、続いて配列決定し、そして 1.2 kb の STE2 コード領域及び関連する 5' フランク配列を含むことが見出された。STE2 の DNA 配列は、第 9 図に示される。

pAH1 に存在する STE2 コード配列を、プラスミド SupP dimer-ap8 (Muero and Pelham, *EMBO J.* 3: 3087-3093) 中にサブクローンし、プラスミド STE2-SupP #6 (第 2 図) を製造した。この切断された STE2-物質 P の融合は、酵母ベクター YEp13 中へのサブクローン及び leu2 変異株中への形質転換に基づいて、宿主細胞における leu2 変異を補うことができるタンパク質をコードすることが示され、これは α -因子への細胞の応答及び MAT α 細胞との接合を可能にする。

例 2-酵母細胞におけるハムスター β -アドレナリンレセプター STE2 融合体の発現

A. ハムスター β -アドレナリンレセプター-STE2 レセプター融合体をコードする DNA 構造体の構成

ハムスター β -AR (Dixon など、前記、1986) 及び サッカロミセス セレビシアエ STE2 遺伝子生成物は、第 1 図に示される構造を共有することが予測された。リガンド結合に対するドメイン

L2、L4 及び L6 の関係を研究するために、STE2 遺伝子生成物の L2 及び/又は L4 ドメインを、インビトロ 変異誘発 (Zoller and Smith *DNA* 3: 479-488, 1984) 及びリンカー付加を用いて、ハムスター β -AR の対応するドメインにより置換した。

ハムスター β -AR L4 による STE2 L4 の置換は、ハムスター β -AR (第 3 図) をコードするオリゴヌクレオチドアダプターにより STE2 L4 を置換することによって達成された。4 種のオリゴヌクレオチドは、アニーリングに基づいて、5' HhaI 付着性末端、続いて、第 3 図のヌクレオチド 522~585 に対応する酵母コード-最適化ハムスター β -AR L4 DNA 配列に連結される STE2 TMD4 の一部をコードする第 8 図のヌクレオチド 554~573、続いて N:11 付着性末端をコードするように企画された。第 4 図に関しては、プラスミド pAH1 を SallI 及び HhaI により切断し、STE2 の一部のコード領域を含む 1.3 kb のフラグメントを単離した。プラスミド pAH1 を SphI により線状化し、そして N:11 により部分的に切断し、STE2 配列 3' ~ STE2 L4 を含む 0.8 kb のフラグメントを単離した。オリゴヌクレオチド ZC1031 (第 1 表)、ZC1032 (第 1 表)、ZC1033 (第 1 表) 及び ZC1034 (第 1 表) を、Applied Biosystems モデル 380A DNA 合成機により合成し、そしてポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。オリゴヌクレオチド ZC1031 及び ZC1032 をキナーゼ処理した。アダプターを、HaeIII など、(前記) により記載される方法を用いて、オリゴヌクレオチド ZC1034 によりオリゴヌクレオチド ZC1031 をアニーリングし、そしてオリゴヌクレオチド ZC1033 によりオリゴヌクレオチド ZC1032 をアニーリングすることによって形成した。ベクター pUC118 を、SallI 及び SphI による消化により線状化し、そして

pAH1 からの 2 個の単離されたフラグメント及びオリゴヌクレオチド ZC1031/ZC1034 及び ZC1032/ZC1033 のアニーリング化された対による 5 部分連結により連結した。その連結混合物を用いて、E. コリ 株 JM83 を形質転換した。この得られた形質転換体から調製されたプラスミド DNA を単離し、そして配列決定し、正しい融合を確認した。酵母コード-最適化ハムスター β -AR L4 配列をコードする DNA 配列により置換された STE2 L4 配列を有する STE2 遺伝子を含んで成る正しい配列を有するプラスミドを、pHRS4 (第 4 図) と命名した。

第 1 表

```

ZC87    5' TCC CAG TCA CGA CGT3'
ZC237   5' GCC AGT GAA TTC CAT TGT GTA TTA3'
ZC410   5' CGT AAT ACA GAA TTC CCG GCG3'
ZC1031  5' CGC CTT TTG GTG AGT AGC AAC CAT CAT ACC CTT
        AAC ACC G3'
ZC1032  5' CTG TTA CGA GAA GGA AAC TTG TTG TGA CTT CTT
        CAC TAA TCG A 3'
ZC1033  5' TTA GTG AAG AAG TCA CAA CAA GTT TCC TTG TGG
        TAA CAG TCG AT 3'
ZC1034  5' CTG TTA ACC GTA TCA TCG TTG CTA CTC ACC AAA
        AGG CGA TCG A 3'
ZC1039  5' ACT CTA TTT TAA ATA TCT CTT AAG TAA TTA CTC
        TTC AG 3'
ZC1040  5' TTA AGT GTT AAG AAG ATG TCG AAC TTG GGT AAC TTC
        TGG TGT GAA TTC TCG ACT TCT ATC GAC GG 3'
ZC1041  5' CGC CGT CGA TAG AAG TCC AGA ATT CAC ACC ACA
        AGT TAC CGA AGT TCC ACA TCT TCA TAA CAC 3'

```

```

ZC1042  5' ATG TTT ATG GCG CCA CAA ATA TAA T 3'
ZC1413  5' AAT TCT ACA C 3'
ZC1414  5' CAT GGT GTA G 3'
ZC2719  5' AAT TCA AAA AAT GTC TGA TCG GGC TCG TTC ATT
        GAG CAA TCT ATT TTA TGA TCC AAC GTA TAA TCG TCG
        TCA AAG CAC CAT TAA CTA CAC TTC CAT ATA TGG GAA
        TGG ATC CAC CAT CAC TTT CGA TGA GTT GCA AGG TTT
        AGT TAA CAG TAC TCT TCG CAT GGG CAT CGT CAT GTC
        TCT CAT CGT CCG GG 3'
ZC2720  5' CGA GGA CGA TGA GAG ACA TGA CGA TCG CGA TCG
        CAA CAG TAC TGT TAA CTA AAC CTT GCA ACT CAT CGA
        AAG TGA TCG TCG ATC CAT TCG CAT ATA TGG AAG TGT
        AGT TAA TGG TCG TTT CAC CAG GAT TAT ACC TTG CAT
        CAT AAA ATA GAT TCG TCA ATG AAG GAG CCG CAT CAG
        ACA TTT TTT G 3'
ZC2750  5' AAC ATT GAG CAT GTG ATC CAG GAT AAC CTC ATC
        CGT AAG GAA GTT TAC ATC CTC CTA AAT TGG ATA GGC
        TAT GTC AAT TCT GGT TTC AAT CCG CTT ATC TAC TCG
        CGG GCT GCT AAT AAT GCA 3'
ZC2751  5' TTA TTA GCA GCG CGG CAG TAG ATA AGG CGA TTG
        AAA CGA GAA TTG ACA TAG CCT ATC CAA TTT AGG AGG
        ATG TAA ACT TCG TTA CGG ATG AGG TTA TCC TCG ATC
        ACA TCG ACA TTG TT 3'
ZC2907  5' GCC ATT GCG AAG TTC CAG CGT 3'
ZC2909  5' ATA TAT TCT ACA GCT TTA CAG CAG TGA GTC A 3'
ZC2913  5' TCG AGA ACA TTC CTT GGT CTC AAG CAG TTC CAT
        AGT TTA GCG ATC ATC ATG G 3'

```

ZC2914 5' GTA CCC ATG ATG ATG CCT AAA CTA TCG AAC TCG
TTC AGA CGA AGG AAT CTT C 3'
ZC3120 5' CAT CAT GGG TAC CTT CAC CCT CTG C 3'
ZC3132 5' CCT CTT GAA AGG TCG ACC GGT AGA CGA AGA CCA
TGA TC 3'
ZC3326 5' GAA GGA TCC TGA AAT CTE GGC TC 3'
ZC3327 5' GAT CCT GTA GT 3'
ZC3328 5' CTA GAC TAC AG 3'
ZC3550 5' AAT TCA AGC TTG GAT CCA AGA ATC AAA AAT GTC
TGA TCG GGC TCC TTC ATT GAT GCA ATC TAT TTT ATG
ACG T 3'
ZC3551 5' CAT AAA ATA GAT TGC TCA ATG AAG GAG CCG CAT
CAG ACA TTT TTG ATT CTT GGA TCC AAC GTT G 3'

プラスミドpHRS4におけるSTE2-β: ARハイブリッドをコードする配列を、酵母での発現のために酵母シャトルベクターYEp13中にサブクローンした。プラスミドpHRS4を、BamHI及びSphIにより消化し、STE2-βAR融合体を含む2.3Kbのフラグメントを単離した。プラスミドYEp13を、BamHI及びSphIにより消化し、そのベクターを線状化した。その線状化されたベクターを、STE2-βAR融合フラグメントと連結した。得られたプラスミドを、pHRS6(第4図)と命名した。

第5図に示されるように、STE2 L2をコードするDNA配列を、STE2 L2領域の境界上にユニーク制限部位をまず挿入した後、酵母コドン最適化ハムスターβAR L2をコードするDNA配列により置換した。オリゴヌクレオチドZC1039(第1表)及びZC1042(第1表)を、それぞれL2の5'境界でAflII部

2フラグメント及び4.8KbのSTE2+pUC9フラグメントを3部分連結により連結し、pHRS8を生成し、ここでそれは、酵母コドン最適化ハムスターβAR L2により置換されたSTE2 L2を有するSTE2をコードするDNA配列を含んで成る(第5図)。

pHRS8に存在する変異性STE2遺伝子を、酵母ベクターYEp13の誘導体であるpJH50中にサブクローンした。pJH50を構成するために、YEp13を変性し、SalIによるYEp13の部分消化、続くXhoIによる完全な消化によりLEU2遺伝子近くのSalI部位を破壊した。LEU2遺伝子及び8.0Kbの線状YEp13ベクターフラグメントを含んで成る2.0KbのXhoI-SalIフラグメントを、単離し、そして一晩に連結した。その連結混合物を用いて、E. coli株RR1を形質転換した。DNAをその形質転換体から調製し、そしてSalI及びXhoIによる消化により分析した。LEU2フラグメントが親プラスミドYEp13に対して反対の方向に挿入されたことを示唆する、単一のSalI部位及び不活性XhoI部位を示すクローンを単離した。そのプラスミドを、pJH50と命名した。

第5図に示されるように、プラスミドpHRS8を、SalIにより部分的に消化し、そしてSmaIにより完全に消化し、2Kbの変異性STE2フラグメントを単離した。このフラグメントを、SalI及びPvuIIによる消化により線状化されたpJH50に連結した。得られたプラスミドを、pHRS5と命名した。

ハムスターβAR L2及びL4により置換されたSTE2 L2及びL4と共に、STE2-ハムスターβAR融合体をコードするDNA構造体を含んで成る酵母発現ベクターを、次の通りに構成した。プラスミドpHRS8をSalI及びEcoRVにより

位及びL2の3'境界でNarI部位を配置するように企画した。プラスミドSTE2-SubP #6を、Winkler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, 1985)により記載される方法を用いて、インビトロ突然変異誘発にゆだねた。オリゴヌクレオチドZC1039及びZC1042を、第1及び第2プライマーとして使用した。突然変異誘発の後、変異体を選択し、そして配列決定し、両変異部位を含むプラスミドを同定した。STE2 L2を塩に有するAflII部位及びNarI部位を含む正しいプラスミドを、STE2 #4 1039+1042と命名した。STE2 #2 1039+1042に存在する突然変異誘発されたSTE2コード配列を、BamHI-EcoRIにより線状化されたpUC9中にEcoRI-BglIIフラグメントとしてサブクローンし、プラスミドpHRS7(第5図)を生成した。

第5図に示されるように、STE2 L2を、5'末端上のAflII部位及び3'末端のNarI部位を両端に有するハムスターβAR L2のための配列を含むオリゴヌクレオチドアダプターにより置換した。アニールされる場合、第3図のヌクレオチド280-336に対応する、酵母コドン最適化ハムスターβAR L2アダプターをコードするオリゴヌクレオチドZC1041(第1表)及びZC1040(第1表)を、Applied Biosystemsモデル380A DNA合成機により合成し、そしてポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。オリゴヌクレオチドZC1040及びZC1041を、HaeIIIなど(前記)により記載される方法を用いて、キナーゼ処理し、そしてアニールした。プラスミドpHRS7を、EcoRI及びNarI、及びEcoRI及びAflIIにより消化し、それぞれ約0.85KbのSTE2フラグメント及び約4.8KbのSTE2+pUC9フラグメントを単離した。ZC1040/ZC1041キナーゼ処理されたアダプター、0.85KbのEcoRI-NarI STE2

消化し、1.4KbのSTE2-ハムスターβAR L2フラグメントを単離した。プラスミドpHRS4をEcoRV及びHindIIIにより消化し、STE2-ハムスターβAR L4フラグメントを含む1Kbのフラグメントを単離した。プラスミドpJH50を、SalI及びHindIIIによる消化により線状化し、そして1.4KbのSalI-EcoRVフラグメント及び1KbのEcoRV-HindIIIフラグメントに3部分連結により連結した。その得られるプラスミドを、pHRS9(第6図)と命名した。

B. 酵母におけるSTE2-ハムスターβAR融合体の発現

STE2-ハムスターβAR L2融合体をコードするDNA配列を含んで成るプラスミドpHRS5; STE2-ハムスターβAR L4融合体をコードするDNA配列を含んで成るpHRS6; 及びSTE2-ハムスターβAR L2+L4融合体をコードするDNA配列を含んで成るpHRS9を用いて、Boggs(前記)により記載される方法により、株XH6-10B (MATa ste2-2 adeX leu2-2, 112 lys1 can1) 及びXH9-5C4 (MATa ste2-1 ade2-1 his3 leu2-2, 112 can1)を形質転換した。形質転換体を、ロイシンを欠く合成の完全培地上でのそれらの増殖能力について選択した。

例3-ヒトβ-アプレナリンレセプター-cDNAのクローニング

ヒトβAR cDNAを、ベクターpSP65(第8図)における2.3KbのEcoRIフラグメントとして、Brian E. Koblika (Duke University Medical Center, Durham, NC: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 46-50, 1987)から得た。手順に言及すれば、ヒトβAR cDNAを、ファージλgt11中にクローンされたヒト

胎盤 cDNA ライブラリーから単離した。そのライブラリーを、ハムスター β 、AR ゲノムクローンからの 32 P-ラベルされた 1.3 kb の HindIII フラグメントを用いてスクリーンした。5 程度の組換え体をスクリーンし、1.25~2 kb の挿入体を有する 5 個のユニーククローンの同定をもたらした。制限酵素分析及び交差ハイブリダイゼーションは、より小さなクローンが大きな 2 kb のクローンのフラグメントを覆うことを示した。2 kb のクローンを、チェーンターミネーター法を用いて配列決定した。ヒト β 、AR についての DNA 配列及び推定されるアミノ酸配列は、第 7 図に示される。例 4-酵母細胞におけるヒト β 、AR アドレナリンレセプターの発現

Koblitko (前記) から得られたヒト β 、AR cDNA をコードする DNA 配列を、次のようにして酵母における発現のために酵母発現ベクター中にサブクローンした。

TP11 プロモーターを、プラスミド pTPIC10 (Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet., 1: 410~434, 1982) 及びプラスミド pPATPOT (Kawasaki and Bell, EP 171,142; ATCC 20699) から得た。プラスミド pTPIC10 をユニーク KpnI 部位で切断し、TP11 コード領域を BamHI-SalI エンドヌクレアーゼにより除去し、そして EcoRI リンカー (配列: CCA ATT CC) を、そのプロモーターの 3' 末端に付加した。BglII 及び EcoRI による消化は、BglII 及び EcoRI 付着端を有する TP11 プロモーターフラグメントを生成した。次に、このフラグメントを、BglII 及び EcoRI (部分的) により切断されたプラスミド YRp7' (Stiechcomb など、Nature 282: 39~43, 1979) に導いた。得られるプラスミド FTE32 を、EcoRI (部分的) 及び BamHI により分解し、テトラサイクリン耐性遺伝子の部分を除去した。次に、線状化されたプラスミドを、EcoRI-BamHI

からの部分的 TP11 プロモーターフラグメント及び pPATPOT からのフラグメントを、3 連結により組合せ、pMVR1 (第 8 図) を生成した。

第 8 図に示されるように、pSP65 における β 、AR cDNA 配列を含んで成るプラスミドを、NcoI 及び SalI により消化し、1.7 kb の β 、AR フラグメントを単離した。プラスミド pMVR1 を、EcoRI 及び SalI により消化し、TP11 プロモーター、TP11 ターミネーター及び pICTRI' ベクター配列を含んで成る約 3.7 kb のフラグメントを単離した。合成オリゴヌクレオチド ZC1413 (第 1 表) 及び ZC1414 (第 1 表) を、Maniatis など (前記) により記載される方法を用いて、キナーゼ処理し、そしてフェールし、5' EcoRI 付着端及び 3' NcoI 付着端を有するアダプターを形成した。 β 、AR フラグメント、pMVR1 フラグメント及び合成アダプターを、連結により結合せしめた。TP11 プロモーター、 β 、AR cDNA、TP11 ターミネーター及び pICTRI' ベクター配列を含むプラスミドを、pHRS10 (第 8 図) と命名した。

pHRS10 の β 、AR 発現単位を、酵母中への狭く形質転換のために pJH50 中にサブクローンした。プラスミド pHRS10 を、XhoI 及び HindIII により消化し、TP11 プロモーター、 β 、AR cDNA 及び TP11 ターミネーターを含む約 2.6 kb の発現単位を単離した。フラグメント pJH50 を、SalI 及び HindIII により消化し、1.1 kb のベクターフラグメントを単離した。2.6 kb の pHRS10 フラグメント及び 1.1 kb の pJH50 フラグメントを 2 部分連結により連結し、プラスミド pHRS11 (第 8 図) を生成した。

プラスミド pHRS11 を用いて、Soggs (前記) により記載され

リンカーの付加により再環状化し、プラスミド FTEA32 を生成した。プラスミド FTEA32 を、BglII 及び EcoRI により消化し、そして 900 bp の部分的 TP11 プロモーターフラグメントを、ゲル精製した。プラスミド pIC19H (Marsh など、Gene 22: 481~486, 1984) を BglII 及び EcoRI により切断し、そしてそのベクターフラグメントをゲル精製した。次に、TP11 プロモーターを、線状化された pIC19H に連結し、そしてその混合物を用いて、E. coli RR1 を形質転換した。プラスミド DNA を調製し、そして ~900 bp の BglII-EcoRI フラグメントの存在についてスクリーンした。正しいプラスミドを選択し、そして pICTPI' と命名した。

次に、プラスミド pMVR1 をアセンブルした。プラスミド pICT (Marsh など、前記) を、EcoRI により消化し、そのフラグメント末端を、DNA ポリマラーゼ I (クレノウフラグメント) によりプラント末端化し、そしてその線状 DNA を、T4 DNA リガーゼを用いて再環状化した。得られるプラスミドを用いて、E. coli RR1 を形質転換した。プラスミド DNA を、その形質転換体から調製し、そして EcoRI 部位の損失についてスクリーンした。正しい制限パターンを有するプラスミドを、pICTRI' と命名した。プラスミド pICTRI' を、HindIII 及び NarI により消化し、そして 2500 bp のフラグメントをゲル精製した。一部の TP11 プロモーターフラグメント (約 900 bp) を、NarI 及び SphI を用いて pICTPI' から除去し、そしてゲル精製した。TP11 プロモーターの残りを、SphI 及び HindIII によるそのプラスミドの消化によりプラスミド pPATPOT から得、そして TP11 プロモーターの一部を含む 1150 bp のフラグメントをゲル精製した。pICTRI' フラグメント、pICTPI'

る方法により、サッカロミセス セレビシア 株、XP635-101ac-C1 (MAT α leu2-3,112 Aste2 Abar1::BAR1prom-lacZ gal1), ZY100 (MAT α leu2-3,112 ade2-101 suc2-A9 gal2 pep4::TP11prom-CAT) 及び ZY400 (MAT α leu2-3,112 ade2-101 suc2-A9 gal2 pep4::TP11prom-CAT Amn9::URA3) を形質転換した。形質転換体を、アミノ酸ロイシンを欠く合成の完全培地におけるそれらの増殖能力について選択した。

形質転換体を、Dixon など (前記, 1987) により記載される方法からのアッセイを用いて、放射能性リガンド結合される生物学的に活性な β 、AR の存在についてアッセイした。そのアッセイは、酵母発現された β 、AR レセプターからの、 β 、AR の他に細胞膜に非特異的に結合し、そして β 、AR 拮抗薬と思われるラベルされたヨードタイアノビンドロール (125I-CYP) の β 、AR リガンドによる置換に依存する。プラスミド pHRS11 形質転換体を、-LEUD 培地 (第 2 表) 250 ml 中に接種し、そして 30°C で一晩増殖した。その一晩の培養物を、新鮮な -LEUD 培地中に 1:2 に希釈し、そして 30°C で 2 時間、増殖した。対数相細胞を、遠心分離によりペレット化し、そして細胞を、結合緩衝液 (第 2 表) 20 ml により洗浄した。A α を、1:100 の希釈度で取り、細胞の密度を評価した。

第 2 表

培地配合表

-Leu Thr Trp アミノ酸混合物
アデニン 4 g

L-アルギニン 3 g
 L-アスパラギン酸 5 g
 L-ヒスチジンフリー塩基 2 g
 L-イソロイシン 5 g
 L-リシン-モノ塩酸塩 4 g
 L-メチオニン 2 g
 L-フェニルアラニン 6 g
 L-セリン 5 g
 L-チロシン 5 g
 ウラシル 4 g
 L-バリン 6 g

すべての成分を混合し、そして乳び及び乳様により、その混合物が細かく粉砕されるまで、粉砕する。

—LEUD

グルコース 20 g

アミノ酸を含まない酵母浸漬塩基

(DIFCO Laboratories Detroit, MI) 6, 7 g

-Leu Thr Trp アミノ酸混合物 0, 6 g

すべての成分を蒸留水中で混合する。蒸留水を添加し、最終体積を1 Lにする。15分間オートクレーブ処理する。オートクレーブの後、L-トリプトファン150 mg及びL-トリプトファン40 mgを添加する。

結合緩衝液

15 mMのトリス、pH 7, 5

12, 5 mMのMgCl₂

0, 3 MのEDTA

レセプター結合リガンドを測定するために、レセプター結合の

イソプロテレノール、エビネフリン及びノルエビネフリンによる競争結合アッセイを、上記のようにして形質転換体に対して行なった。但し、結合緩衝液3 ml中、 3×10^6 個の細胞に添加される75 pHのCYP+1 mMのアルプレノロールの飽和濃度を、宿主細胞上に存在するCタンパク質結合レセプターの合計利用能力を決定するために調整した。さらに、75 pHの¹²⁵I-CYPと共に混合されるイソプロテレノール、エビネフリン及びノルエビネフリンの一連の希釈溶液を含むアッセイ管(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を調製した。リガンド イソプロテレノール、エビネフリン及びノルエビネフリンについての最大%を、リガンドの濃度の負の対数の関数としてプロットした。個々のリガンドについての最大%は、下記等式を用いて決定された。

$$\left(\left(\left[\text{CYP} + \text{リガンド} \right] - \left[\text{exALP} + \text{CYP} \right] \right) + \left(\left[\text{CYP} \right] - \left[\text{exALP} + \text{CYP} \right] \right) \times 100 = \text{最大\%}$$

ここで、

$\left[\text{CYP} \right]$ = 合計の結合計数

exALP = すべての利用できるレセプターのために¹²⁵I-CYPと競争することができるALPの過剰濃度

$\left(\text{exALP} + \left[\text{CYP} \right] \right)$ = 過剰ALPの存在下での非特異的結合計数

$\left(\left[\text{CYP} + \text{リガンド} \right] \right)$ = リガンドの濃度の存在下での非特異的結合計数

イソプロテレノール、エビネフリン及びノルエビネフリン並びにpHRS11により形質転換されたZY100細胞を用いてのリガンド結合アッセイのための代表的な競争結合曲線は、第10及び11図に示される。

¹²⁵I-CYPの置換を、非特異的に結合された¹²⁵I-CYPの計数から、既知のβ₂ ARリガンド、たとえばアルプレノロール(ALP)の存在下で結合される¹²⁵I-CYP計数を引き算することによって測定した。β₂ AR作用薬及び拮抗薬を用いての競争結合実験は、飽和濃度のALPの存在下で結合される¹²⁵I-CYP計数から一連の希釈された作用薬又は拮抗薬の存在下で結合される¹²⁵I-CYP計数を引き算することによって測定された。

飽和結合実験を、次の通りに行なった。高まる濃度の¹²⁵I-CYP(New England Nuclear)を、10 μMのALP(Sigma, St. Louis, MO)の存在又は不在下で 3×10^6 個の細胞を含む結合緩衝液と共にインキュベートした。その混合物を、22℃で30分間インキュベートした。インキュベーションの間、その混合物を1度攪拌した。その混合物1 mlアリコートをし、ガラス繊維G/FC Whatmanフィルターに負荷した。細胞を、吸引により結合緩衝液10体積により洗浄した。次に、フィルターを、ガンマカウンター上で数えた。結合計数は、結合された¹²⁵I-CYPの量を示した。下記等式により測定されるレセプター結合計数を、濃度の対数の関数としてプロットした。pHRS11形質転換体により発現されるβ₂ ARを飽和することが見出されるALPの濃度は、少なくとも10 μMであることが見出された。ALPの飽和濃度の100倍が、続いて、競争結合実験のために使用された。 $\left(\left[\text{CYP} \right] - \left[\text{ALP} + \text{CYP} \right] \right)$ = レセプター結合計数

ここで、

$\left(\left[\text{CYP} \right] - \left[\text{ALP} + \text{CYP} \right] \right)$ = 合計の結合計数であり、そして

$\left(\left[\text{ALP} + \left[\text{CYP} \right] \right] \right)$ = 非特異的結合計数である。

イソプロテレノール、エビネフリン及びノルエビネフリンによる競争結合アッセイを、上記のようにして形質転換体に対して行なっ

例5—ヒトβ₂-アドレナリン-STE2ハイブリッドレセプターの構成及び発現

A. pHRS17の構成

ヒトβ₂-アドレナリン-STE2ハイブリッドレセプターをコードするDNA配列を含んで成るDNA構築体を、ヒトβ₂ ARの細胞外アミノ末端ドメインをコードするDNA配列をSTE2遺伝子生成物の細胞外アミノ末端ドメインをコードするDNA配列により置換することによって構成した。構築体プラスミドpHRS16、オリゴヌクレオチドZC2719及びZC2720を、EcoRI付着端、続いて第7図のヌクレオチド103~136に連結される第9図のヌクレオチド1~147を含むSTE2遺伝子生成物の細胞外アミノ末端ドメインにより5'末端をコードするように企画した。オリゴヌクレオチドを合成し、そしてApplied Biosystemsモデル380A DNA合成機上でリン酸化し、そしてオリゴアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。キナーゼ処理されたオリゴヌクレオチドを、BanIIなど(前記)により認識される方法を用いてアニールした。pSP65におけるβ₂ AR cDNA配列を含むプラスミドを、BamHI及びSalIにより消化し、第7図のヌクレオチド137~1242からのβ₂ ARコード配列を含む1, 8 kbのフラグメントを単離した。プラスミドpMVR1を、EcoRI及びSalIにより消化し、TP11プロモーター、TP11ターミネーター及びpIC7R1"ベクター配列を含む3, 7 kbのフラグメントを単離した。ZC2719/ZC2720オリゴヌクレオチドアダプター、β₂ ARフラグメント及びpMVR1ベクターフラグメントを、4部分連結により連結した。得られるプラスミドを、pHRS16と命名した。

TP11プロモーター、STE2-β₂ ARコード配列及び

TP11ターミネーターを含んで成る、pHRS16からの発現単位を、酵母シャトルベクターpJH50中にサブクローンした。プラスミドpHRS16を、HindIII及びXhoIにより消化し、2.8Kbの発現単位を単離した。プラスミドpJH50を、SalI及びHindIIIにより消化し、ベクターフラグメントを単離した。pHRS16及びpJH50フラグメントを連結し、そして得られるプラスミドを、pHRS17と命名した。

B. pHRS18の構成

ハイブリッドヒトβ: AR-STE2レセプターをコードするDNA配列を含むDNA構造体を、ヒトβ: ARカルボキシ末端内部エフェクタードメインをコードするDNA配列をサッカロミセスセレビシアE STE2遺伝子生成物の対応するドメインをコードするDNA配列により置換することによって、ヒトβ: ARコード配列から構成した。プラスミドpHRS18を、次の通りに構成した。

合成オリゴヌクレオチドを、3' NsiI付着部を端に有する第8図の892~903のヌクレオチド配列に連結される第6図の871~985のヌクレオチド配列を含んで成るβ: AR-STE2アダプターをコードするように企画した。前記オリゴヌクレオチドを合成し、そしてApplied Biosystemsモデル380A DNA合成機によりリン酸化し、そしてアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。そのオリゴヌクレオチドを、Maniatisなど、(前記)により記載される方法を用いて、アニールした。

プラスミドpHRS10を、XhoI及びHpaIにより消化し、TP11プロモーター及び5' β: AR cDNA配列を含む1.7Kbのフラグメントを単離した。プラスミドpAH3を、NsiI及びHindIIIにより消化し、カルボキシ末端内部エフェクター

ドメインをコードする配列及び関連するSTE2 3' 未翻訳配列を含むフラグメントを単離した。プラスミドpJH50を、SalI及びHindIIIにより消化し、ベクターフラグメントを単離した。ZC2750/ZC2751アダプター、pHRS10フラグメント、pAH3からのSTE2フラグメント及びpJH50ベクターフラグメントを、4部分連結により結合せしめた。得られるプラスミドを、pHRS18と命名する。

C. pHRS40の構成

STE2細胞外アミノ末端の一部及び第3内部ドメイン(それぞれEATD及び3-ID)を有するヒトβ: AR-STE2ハイブリッドレセプターをコードするDNA配列を含んで成るDNA構造体を、ヒトβ: ARのEATD及び3-IDをコードするDNA配列をSTE2遺伝子生成物のEATD及び3-IDをコードするDNA配列により置換することによって構成した。

プラスミドpHRS20を、第3内部ドメインを端に有するユニーク制限部位を有するβ: ARフラグメントを生成するためのポリメラーゼ反応で、オリゴヌクレオチドZC3120及びZC2909、及びZC3132及びZC2907(第1表)を用いて構成した。STE2の第3内部ドメインを、ZC2914(第1表)によりオリゴヌクレオチドZC2913をアニールすることによって形成されたオリゴヌクレオチドアダプターから生成した。ポリメラーゼ反応において誘型として使用されるβ: ARコード配列を、HindIII消化されたpHRS10(例4、第8図)から得た。pHRS10のHindIII消化は2つのフラグメントを生成し、その1つはTP11プロモーター、β: ARコード配列、TP11ターミネーターを含み、そして他の1つはpICTRI⁺ベクター配列を含む。

第7図のヌクレオチド831~1242からのβ: ARの3'コ

ード配列をコードし、そしてTMD5内のAsp718部位及びXbaI 3'部位β: AR停止コドンを含むフラグメントを、誘型としてHindIII消化されたpHRS10を用いてPCR増幅により生成した。1μgのHindIII消化されたpHRS10を、製造業者により記載される条件下で100μlの反応体積で個々のオリゴヌクレオチドZC3120及びZC2909の100pモルを用いて、GeneAmpキット(Pierce Elmer Cetus PCR, Norwalk, CT)により増幅した。30回のサイクル(94℃で30秒、45℃30秒及び72℃で2分間)、続く72℃で7分間のインキュベーションの後、サンプルを4℃に冷却し、そしてアガロースゲルにおいて電気泳動した。PCR-生成フラグメントを、ゲル精製し、そしてAsp718及びXbaIにより消化し、停止コドンを通して、β: AR TMD5からβ: ARコード配列を含む0.42Kbのフラグメントを単離した。

第7図のヌクレオチド169~676からのβ: ARの5'コード配列の一部をコードし、そしてヌクレオチド194でのPstI部位及びTMD5内のSalI部位を有するフラグメントを、上記条件で、100μlの反応体積で個々のオリゴヌクレオチドZC3132及びZC2907(第1表)の100pモルを用いて上記のようにしてHindIII消化されたpHRS10からのPCR増幅により生成した。ゲル精製されたフラグメントを、PstI及びSalIにより消化し、開始コドン~TMD5内のSalI部位のβ: ARコード配列を含む0.46Kbのフラグメントを単離した。

上記のようにして合成されたオリゴヌクレオチドZC2913及びZC2914を、アニールする場合、STE2 3-IDをコードする54bpのXhoI-Asp718アダプターを形成するように企画した。オリゴヌクレオチドZC2913及びZC2914をキナーゼ処理し、

そしてSambrookなど、(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York, 1989. 本明細書に引用により組込まれる)により記載されるようにしてアニールした。

プラスミドpHRS20を、5' β: ARコード配列の一部を含む0.464KbのPstI-SalIフラグメント、STE2 3-IDをコードするZC2913/ZC2914アダプター及び3' β: ARコード配列を含む0.42KbのAsp718-XbaIフラグメントを、TP11プロモーター、5' β: ARコード配列、pICTRI⁺ベクター配列及びTP11ターミネーターを含むpHRS10の3.9KbのPstI-XbaIフラグメントと共に連結することによってアセンブルした。プラスミドpHRS20を、制限分析により確かめた。pHRS20の配列分析は、第7図のヌクレオチド918に対応する点でA→Gサイレント(silent)変異を示した。

β: AR EATDをコードする配列を、まずAatII及びXhoIによりpHRS20を消化し、ハイブリッドβ: AR-STE2レセプターコード配列及びTP11ターミネーターを含む1.15Kbのフラグメントを単離することによってSTE2 EATDの一部により置換した。上記のようにして合成されたオリゴヌクレオチドZC3550及びZC3551(第1表)を、キナーゼ処理し、そしてアニールし、STE2(第9図のヌクレオチド1~42)の初めの14個のアミノ酸をコードするEcoRI-AatIIアダプターを形成した。1.15KbのpHRS20フラグメント及びZC3550/ZC3551アダプターを、SalI-EcoRIにより線状化されたpUC18により連結し、そして制限分析及び配列分析により確かめられたその得られるプラスミドを、pHRS45と命名する。

pHRS45に存在するβ: AR-STE2コード配列を、酵母発現ベクターpJH50中にサブクローンした。プラスミドpHRS45

を、EcoRI及びHindIIIにより消化し、 β : AR-STE2コード配列及びTPIIターミネーターを含む1.21kbのフラグメントを単離した。

ADH2プロモーターを、BamHI-EcoRIフラグメントとしてプラスミドp410WTから得た。p410WTに存在するADH2プロモーターは、pBR322-ADR2-BSa(VIII-asea など、前記)に由来した。野生型ADH2構造遺伝子及びpBR322-ADR2-BSaからの5'フランキンゲン配列を含む2.2kbのBamHIフラグメントと、BamHIにより線状化されたM13mp19とを連結した。挿入体の配向は、制限分析により決定された。部位特異的インビトロ突然変異誘発(Zollerなど、DNA 3: 479-488, 1984)及び第2プライマーとしてZC237(第1表)を用いて、ADH2遺伝子の構造部分を、M13mp19におけるADH2挿入体から除去し、そしてm13mp19のポリリンカーのEcoRI部位と共に翻訳開始シグナルを含む5'フランキンゲン配列に連結した。陽性クローンから調製された複製形DNAを、BamHI及びEcoRIにより消化し、1.2kbのプロモーターフラグメントを単離した。この1.2kbのフラグメントを、BamHI及びEcoRIによる線状化されたpUC13中に連結し、プラスミドp237-Wtを生成した。

次に、ADH2プロモーターを、プラスミドpAT-1における α -1-抗トリプシン(AAT)の成熟形の初めのアミノ酸のためのコドンに融合した。プラスミドpAT-1は、プラスミドpVR1(例4)からのAAT cDNA-TPIIターミネーター配列に連結されるp237-WtからのADH2プロモーターの発現単位を含んで成る。これらの配列を、ベクターpCPOTの部分中に挿入した。(プラスミドpCPOTは、E. coli株HB101形質転

により確かめた。容易な操作のために、突然変異誘発された部分的ADH2プロモーターフラグメントを、SphI及びEcoRIにより線状化されたpUC19中に、175bpのSphI-EcoRIフラグメントとしてサブクローンした。p410ESと命名されたその得られるプラスミドは、ADH2プロモーターの3'のほとんどの175bpを含んだ。野生型ADH2プロモーターを、p410ESからの部分的ADH2プロモーターフラグメントを用いて再生した。プラスミドp410ESを、SphI及びEcoRIにより消化し、175bpの部分的ADH2プロモーターフラグメントを単離した。このフラグメントを、pBR322-ADR2-BSaに由来する1kbのBamHI-SphIフラグメントと共に、3部分連結により、BamHI及びEcoRIによる消化により線状化されたpUC13中に連結した。pBR322-ADR2-BSaに由来する1kbのフラグメントは、野生型ADH2プロモーター配列と相同である配列を含んだ。前記3部分連結に起因するプラスミドを、制限分析により確かめ、そしてp410WTと命名した。

プラスミドp410WTを、BamHI及びEcoRIにより消化し、1.2kbのADH2プロモーターフラグメントを単離した。その1.2kbのBamHI-EcoRI ADH2フラグメント及びpHRS45からの1.21kbのEcoRI-HindIIIフラグメントを、HindIII-BamHI線状化pJH50に連結した。得られるプラスミドを、pHRS40と命名する。プラスミドpHRS40を用いてS. cerevisiae株ZY100及びXP636-101lac-C1を形質転換し、そして形質転換体を、上記のようにして生物学的に活性な β : ARの存在についてアッセイする。

D. pHRS41の構成

β : AR EATDを、DNA構造体(ここで β : ARの3'非

換体としてATCCに寄託されており、そして寄託番号39685を付与されている。それは、すべての2ミクロンプラスミドDNA、leu2-d遺伝子、pBR322配列及びシジラカロミセス・ボムベ(Schizosaccharomyces pombe) POT1遺伝子を含んで成る。)プラスミドpCPOTを、BamHI及びSalIにより消化し、約10kbの線状ベクターフラグメントを単離した。プラスミドpMVR1を、EcoRI及びXbaIにより消化し、1.5kbの α -1-抗トリプシンcDNA-TPIIターミネーターフラグメントを単離した。1.2kbのADH2プロモーターフラグメントを、BamHI-EcoRIフラグメントとしてp237-Wtから単離し、そして1.5kbの α -1-抗トリプシンcDNA-TPIIターミネーターフラグメント及び線状化されたpCPOTに3部分連結により連結し、pAT-1と命名されるプラスミドを生成した。

プラスミドpAT-1からのADH2プロモーターを、pAT-1(第4図)に見出されるADH2翻訳開始部位及びpUC18ポリリンカー配列を除去することによって質性し、"普遍的"プロモーターを生成した。プラスミドpAT-1をSphI及びBamHIにより消化し、190bpの部分的ADH2プロモーターフラグメントを単離した。このフラグメントを、BamHI及びSphIにより線状化されたM13mp18中に連結した。得られる構造体を、突然変異誘発物質としてZC410(第1表)及び第2プライマーとしてZC87を用いて、インビトロ突然変異誘発(Zollerなど、前記)にゆだねた。ZC410を用いての突然変異誘発は、ADH2翻訳開始シグナル及びpUC18ポリリンカー配列とSmaI部位でm13mp18ポリリンカーに融合される単一のEcoRI部位とを置換する。陽性クローンを、融合点を通してジデオキシ配列決定

コード領域が除去されている)を用いて、STE2 EATDの一部と置換した。切断された β : ARを、鑄型としてオリゴヌクレオチドZC2909及びZC2907(第1表)及びHindIII消化されたpHRS10を用いてフラグメントのPCR増幅により生成した。Gensetキット(Parkin Elmer Celco)を用いて、LogのHindIII消化されたpHRS10及び20pmの β : ARのオリゴヌクレオチドZC2909及びZC2907を、上記に示される条件を用いてフラグメントを増幅するために使用した。増幅の後、上記条件を用いて、フラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した。ゲル精製されたフラグメントを、PstI及びXbaIにより消化し、停止コドンの3'側にXbaI部位を有する β : ARの3'部分を含む1.06kbのPstI-XbaIフラグメントを単離した。その1.06kbのフラグメントを、5' β : ARコード配列、TPIIプロモーター、pIC7RI⁺ベクター配列及びTPIIターミネーターを含む、PstI-XbaI消化されたpHRS10に連結した。得られるプラスミドを、pHRS22と命名する。

プラスミドpHRS22に存在する β : AR EATDを、STE2 EATDの一部と置換し、そしてその発現単位を、酵母発現ベクター中にサブクローンした。プラスミドpHRS22を、PstI及びHindIIIにより消化し、3' β : ARコード領域を含む1.1kbのフラグメントを単離した。プラスミドpHRS40を、SalI及びPstIにより消化し、ADH2プロモーター及び5' STE2 EATD- β : ARコード領域を単離した。1.7kbのSalI-PstIフラグメント及び1.1kbのPstI-HindIIIフラグメントを、SalI-HindIII消化されたpJH50に連結し、pHRS41を生成した。プラスミドpHRS41を、S. cerevisiae株ZY100及びXP636-101lac-

上記のようにして合成されたオリゴスクレオチド ZC3327 及び ZC3328 を、アニールする場合、 β 、AR 及び β 、AR-STP2 PCR-生成されたフラグメントのための置換停止コドンにコードする BamHI-XbaI 部位アダプターを製造するように企画し

前記発明は、明確な理解のためにいくらか詳細に例示的に記載して来たけれども、いくらかの変更及び修飾が請求の範囲内で行なわれ得ることが明らかであろう。

pHRS31及びpHRS32のB、AR EATDを、STE2 EATDの一部と置換し、そして発現単位を屏東発現ベクター中にサブクローンした。プラスミドpHRS31及びpHRS32を、Pst I及びHind IIIによりそれぞれ消化し、3' B、AR又はB、AR-STE2コード配列及びTP11ターミネーターを含む、それぞれ0.9 kb及び0.77 kbフラグメントを単離した。プラスミドpHRS40をSal I及びPst Iにより消化し、STE2 EATD-B、ARコード配列に連結されるADH2プロモーターを含む1.7 kbのフラグメントを単離した。pHRS31及びpHRS32から単離されたPst I-Hind IIIフラグメントを、pHRS45からの1.7 kbのSal I-Pst Iフラグメント及びSal I-Hind IIIにより環状化されたpJH50にそれぞれ連結した。pHRS45フラグメントとpHRS31フラグメントとの連結に起因するプラスミドを、pHRS42と命名した。pHRS32フラグメント及びpHRS45フラグメントの

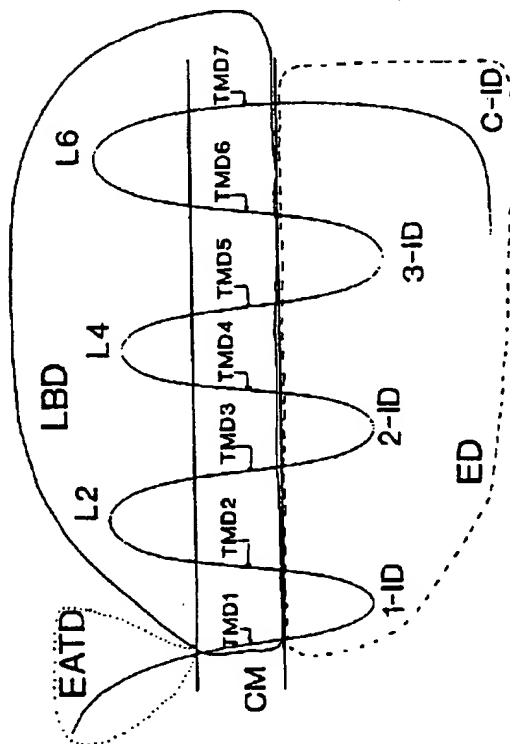


Fig. 1

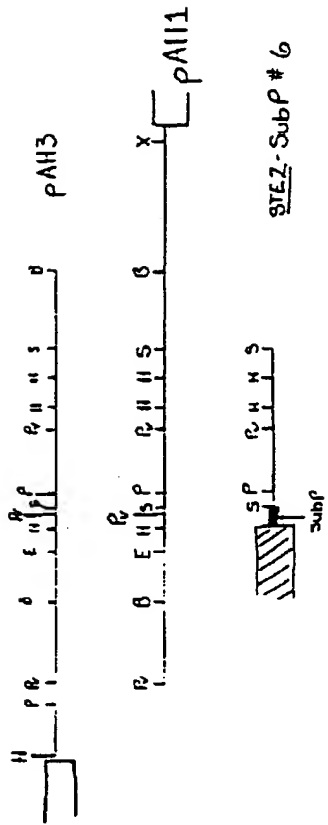


Figure 2.

Figure 3

ATG	GCG	GCA	GCC	GCG	AAC	GAC	AGT	GAC	TTT	TTG	CTG	ACA	ACC	AAC	GCA	AGC	CAT	37
Met	Gly	Pro	Pro	Gly	Asn	Asp	Ser	Asp	Phe	Leu	Leu	Thr	Thr	Asn	Gly	Ser	His	81
GTG	CCA	GAC	CAC	GAT	GTC	ACT	GAG	GAA	CGS	GAC	GAA	GCA	TGC	GTC	GTA	GCG	GCC	109
Val	Pro	Asp	His	Asp	Val	Thr	Glu	Glu	Arg	Asp	Glu	Ala	Trp	Val	Val	Gly	Ala	135
ATC	CTT	ATG	TCC	GTT	ATC	GTC	GTC	GCC	ATC	GTG	TTT	GCC	AAC	GTC	GTC	GTC	ATC	163
Ile	Leu	Met	Ser	Val	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Val	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Ile	189
ACA	GCC	ATT	GCC	AAG	TTT	GAG	AGG	CTA	CAG	ACT	GTC	ACC	AAC	TAC	TAC	ATA	ACC	215
Thr	Ala	Ile	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Leu	Gln	Thr	Val	Thr	Asn	Tyr	Phe	Ile	Tyr	241
TCC	TTG	GCG	TGT	GTT	GAT	CTA	GTT	ATG	SST	CTA	GCG	GTC	GTC	GCC	TTT	GCG	GCC	267
Ser	Leu	Ala	Cys	Ala	Asp	Leu	Val	Met	Gly	Leu	Ala	Val	Val	Pro	Phe	Gly	Ala	293
AGT	CAC	ATC	CTT	ATG	AAA	ATG	TGG	AAT	TTT	GCG	AAC	TTT	TGG	TGC	GAG	TTT	TGG	319
Ser	His	Ile	Leu	Met	Lys	Met	Trp	Asn	Phe	Gly	Asn	Phe	Trp	Cys	Glu	Phe	Trp	345
ACT	TCC	ATT	GAT	GTC	TTA	TGC	GTC	ACA	GCC	ACC	ATT	GAG	ACC	CTG	TGC	ATG	ATG	371
Thr	Ser	Ile	Asp	Val	Leu	Cys	Val	Thr	Ala	Ser	Ile	Glu	Thr	Leu	Cys	Val	Ile	397
GCA	GTG	GAT	GCC	TAC	ATT	GCT	ATC	ACA	TCC	CCA	TTT	AAC	TAC	CAG	AGC	CTC	CTG	423
Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Ile	Ala	Ile	Thr	Ser	Pro	Phe	Lys	Tyr	Gln	Ser	Leu	Leu	449
ACC	AAC	AAT	AAS	GCC	GGA	ATC	GTC	ATC	CTA	ATG	GTC	TGC	ATT	GTA	TGC	GCC	CTT	475
Thr	Lys	Asn	Lys	Ala	Arg	Met	Val	Ile	Leu	Met	Val	Trp	Ile	Val	Ser	Gly	Leu	501
ACC	TCC	TTT	TTG	CCC	ATT	CAG	ATG	CAC	TGG	TAC	CGT	GCC	ACC	CAC	CAG	AAA	GCC	527
Thr	Ser	Phe	Leu	Pro	Ile	Gln	Met	His	Trp	Tyr	Arg	Ala	Thr	His	Gln	Lys	Ala	553
ATC	GAC	TGC	TAT	CAC	AAG	GAG	ACT	TCC	TGC	GAC	TTT	ACC	AAC	CAG	GGC	GGC	TAC	579
Ile	Asp	Cys	Tyr	His	Lys	Glu	Thr	Cys	Cys	Asp	Phe	Phe	Thr	Asn	Gln	Ala	Tyr	605
GCC	ATT	GCT	TCC	TCC	ATT	CTA	TCT	TTT	TAC	GTC	CGT	CTA	GTC	GTC	ATG	CTT	TTT	631
Ala	Ile	Ala	Ser	Ser	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Val	Pro	Leu	Val	Val	Met	Val	Phe	657
GTC	TAC	TTT	ACC	GTC	TTT	CAG	CTG	GCC	AAA	AGC	CAG	CTT	CAG	AAG	ATA	GAC	AAA	683
Val	Tyr	Ser	Arg	Val	Phe	Gln	Val	Ala	Lys	Arg	Gln	Leu	Gln	Lys	Ile	Asp	Lys	709

Figure 3

TCT	GAG	GGA	AGA	TTC	CAC	TCC	CCA	AAC	CTC	GCG	CAG	GTG	GAG	CAG	GAT	GCG	GCG	735
Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	His	Ser	Pro	Asn	Leu	Gly	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Gly	Arg	761
ACT	GCG	CAC	GGA	CTC	CCA	AGC	TCC	TCC	AAG	TTT	TGC	TTG	AAG	GAG	CAC	AAA	GCT	787
Ser	Gly	His	Gly	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Lys	Phe	Cys	Leu	Lys	Glu	His	Lys	Ala	813
CTC	AAG	ACT	TTA	GCC	ATC	ATC	ATG	GCC	ACA	TTT	ACC	CTT	TGC	TGG	CTG	CCC	TTT	839
Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Met	Gly	Thr	Phe	Thr	Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	865
TTT	ATT	GTC	AAC	ATC	GTG	CAC	GTG	ATC	CAG	GAC	AAC	CTC	ATC	CGT	AAG	GAA	GTT	891
Phe	Ile	Val	Asn	Ile	Val	His	Val	Ile	Gln	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Lys	Glu	Val	917
TAC	ATC	CTC	CTT	AAC	TGG	TTG	GCC	TAT	GTC	AAT	TCT	GCT	TTT	AAT	CCC	CTC	ATC	943
Tyr	Ile	Leu	Leu	Asn	Trp	Leu	Gly	Tyr	Val	Asn	Ser	Ala	Phe	Asn	Pro	Leu	Ile	969
TAC	TGT	CGG	ACT	CCA	GAT	TTT	AGG	ATT	GCT	TTG	CAG	GAG	CTT	CTA	TGC	CTC	CGC	995
Tyr	Cys	Arg	Ser	Pro	Asp	Phe	Arg	Ile	Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Cys	Leu	Arg	1021
AGG	TTT	TCT	TCA	AAA	GCC	TAT	GGA	AAC	GCC	TAC	TCC	AGC	AAC	ACT	AAT	GSC	AAA	1047
Arg	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Tyr	Gly	Asn	Gly	Tyr	Ser	Ser	Asn	Ser	Asn	Gly	Lys	1073
ACA	GAC	TAC	ATC	GCG	CAG	GCG	ACT	GCA	TCT	CAG	CTG	GCG	CAG	GAA	AAA	GAA	AGT	1099
Thr	Asp	Tyr	Met	Gly	Glu	Ala	Ser	Gly	Cys	Gln	Leu	Gly	Gln	Ala	Lys	Glu	Ser	1125
GAA	GCG	CTG	TGT	GAG	CAC	CCC	CCA	GAC	ACC	GAA	AGC	TTT	GTG	AAC	TGT	CAA	GCT	1151
Glu	Arg	Leu	Cys	Glu	Asp	Pro	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Phe	Val	Asn	Cys	Gln	Gly	1177
ACT	GTC	CGT	ACC	CTT	ATC	CTT	GAT	TCC	CAA	GCG	AGC	AAC	TGT	ACT	ACA	AAT	GAC	1203
Thr	Val	Pro	Ser	Leu	Asp	Ser	Gln	Gly	Arg	Asn	Cys	Ser	Thr	Asn	Asp			1229
TCA	CGG	CTG	TAA															1255
Ser	Pro	Leu	End															1281

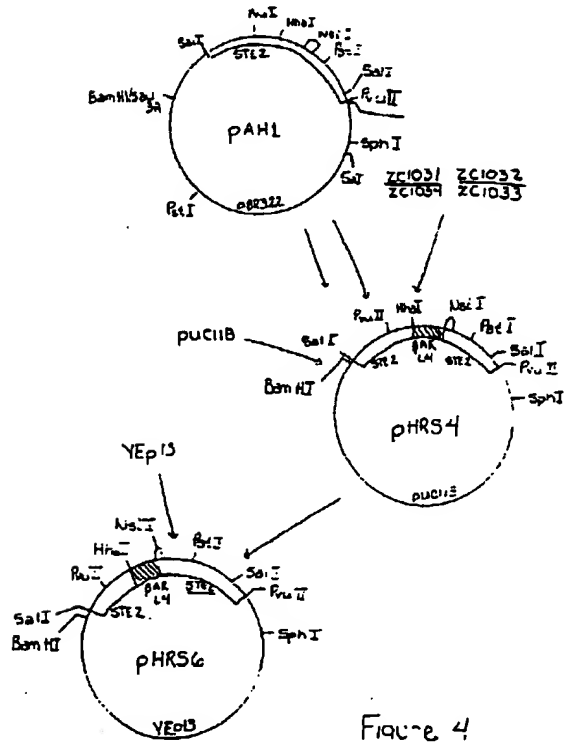
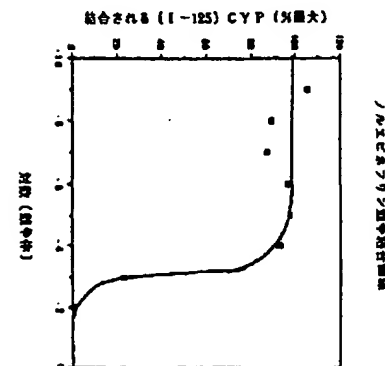


Figure 4



ATG	TCT	GAT	CGC	GCT	CCT	TCA	TTC	AAC	AAT	CTA	TCT	TAT	GAT	CGA	ACG	TAT	AA
Met	Ser	Asp	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu	Ser	Asn	Leu	Phe	Tyr	Asp	Pro	Thr	Tyr	108
81																	109
CCT	GCT	CAA	ASC	ACC	ATT	ACA	TAC	ACT	TCC	ATA	TAT	GCG	AAT	GGA	TCT	ACC	ATG
Pro	Gly	Cis	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ile	Tyr	Gly	Asn	Gly	Ser	Thr	110
128																	103
ACT	TCT	GAT	GAC	TTC	CAA	GCT	TTC	GTT	AAC	ACT	ACT	CTT	ACT	CAC	GCC	ATT	ATG
Thr	Phe	Asp	Glu	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Thr	Val	Thr	Gln	Ala	Ile	Met
TMD2																	216
TTT	GCT	CTC	ACA	TCT	GCT	ACA	GCT	CTC	TTC	ACT	TTC	ATT	GTC	ATG	TGC	ATC	ATA
Phe	Gly	Val	Arg	Cys	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	Val	Met	Tyr	Met	Thr
TMD2																	243
TGC	AGA	AGC	AGA	AAA	ACG	CCG	ATT	TTC	ATT	ATC	AAC	CAA	GTT	CTA	ATG	TTC	TTA
Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Ile	Phe	Ile	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Phe	Leu
397																	324
ATC	ATT	TCT	CAT	TCT	GCA	CTC	TAT	TTC	AAA	TAT	ATA	CTC	TCT	AAT	TAC	TCT	CTA
Ile	Ile	Leu	His	Ser	Ala	Leu	Tyr	Phe	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ser
221																	370
GTC	ACT	TAC	GCT	CTC	ACC	GGA	TTC	CTC	GAC	TTC	ATC	AAT	AGA	GCT	GAC	GTT	ACT
Val	Thr	Tyr	Ala	Leu	Thr	Gly	Phe	Pro	Gln	Phe	Ile	Ser	Arg	Gly	Asp	Val	Ile
TMD3																	403
GTT	TAT	GCT	GCT	ACA	AAT	ATA	ATT	CAA	GTC	CTT	CTT	GTC	GCT	TCT	ATT	GAC	ACT
Val	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asn	Ile	Ile	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Ile	Glu	Thr	Met
459																	788
TCA	CTG	CTG	TTC	CAG	TAA	AAA	GTT	ATT	TTC	ACA	GCC	GAC	AAC	TTC	AAA	AGC	ATA
Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Ile	Lys	Val	Ile	Phe	Thr	Gly	Asp	Asn	Phe	Lys	Arg	Ile
TMD4																	513
GCT	TTC	ATG	CTG	ACG	TCC	ATA	TCT	TTC	ACT	TTA	GCG	ATT	GCT	ACA	GTT	ACC	ATG
Gly	Leu	Met	Leu	Leu	Ser	Ile	Ser	Phe	Thr	Leu	Gly	Ile	Ala	Thr	Val	Thr	Met
367																	394
TAT	TTC	CTA	AGC	GCT	GTT	AAA	GCT	ATG	ATT	GTG	ACT	TAT	AAT	GAT	GTT	AGT	CCC



イソプロテレノール競争結合曲線

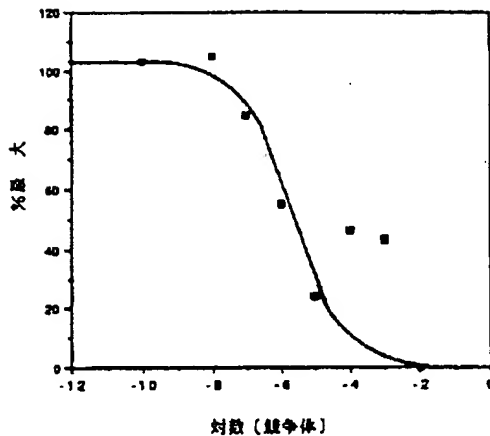


Fig. 11

ハイブリッドGタンパク質結合レセプターを生成するための方法が開示される。ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列が供給され、ここでレセプターは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る。DNA構造体は次の操作的に結合される要素を含んで成る：転写プロモーター、ハイブリッドGタンパク質結合レセプターをコードするDNA配列（ここで前記レセプターは、酵母Gタンパク質結合レセプターの対応するドメインにより置換されたりガンド結合ドメイン以外の少なくとも1つのドメインを有する哺乳類Gタンパク質結合レセプターを含んで成る）及び転写ターミネーター。DNA構造体により形質転換された宿主細胞及び形質転換された細胞を利用する方法がまた提供される。

Application Number **PCT/US 91/00909**

[illegible]

** DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Category of Document, with indication where applicable of the relevant paragraph	Reference to Cover slip
	receptor", pages 1418-1422 see introduction; page 1420; page 1421, lines 1-3	

Y	EP. A. 0351921 (MERCK & CO., INC) 24 January 1990 see page 1; page 2, lines 1-17; claims	1-24

Y	Proc. Natl. Acad. Sci., USA, volume 85 October 1988, Biochemistry, (Washing- ton, DC, USA), S. Cotecchia et al.: "Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor". pages 7159-7165 see the whole document	1-9

国際調査報告

OS 9100908
SA 64935

This report lists the patent family numbers relating to the patent application cited in the above-mentioned international search report.
The numbers are as contained in the European Patent Office EPO file no. 8887/79.
The European Patent Office is to be held liable for their information which are hereby given for the purpose of information.

Patent numbers and its search report	Publication date	Patent family numbers	Publication date
EP-A- 0244221	04-11-87	US-A- 4959609 JP-A- 63272990	22-08-89 27-11-87
EP-A- 0351921	24-01-90	JP-A- 2084121	26-03-90

For more details about this patent, see Official Journal of the European Patent Office, No. 1379.

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5
C 12 N 1/19
15/31
15/82
C 12 P 21/02
//C 12 N 1/19
C 12 R 1: 865)
(C 12 N 15/31
C 12 R 1: 85)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1: 865)

識別記号 庁内整理番号
9050-4B
C 8214-4B

⑥発明者 シェパード, ポール, オー,

アメリカ合衆国, ワシントン 98052, レドモンド, ノースイース
ト セカンド 20717